

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL

MICHELE FLÁVIA SOUSA MARQUES

**Avaliação da resposta imune celular de ovelhas ao desafio por  
*Staphylococcus* spp.**

Recife  
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL

MICHELE FLÁVIA SOUSA MARQUES

**Avaliação da resposta imune celular de ovelhas ao desafio por  
*Staphylococcus* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota

Co-orientador: Fernando Nogueira de Souza

Recife

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- M357 Marques, Michele  
Avaliação da resposta imune celular de ovelhas ao desafio por *Staphylococcus* spp. / Michele Marques. - 2020.  
82 f. : il.
- Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.  
Coorientador: Fernando Nogueira de Souza.  
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em |  
Biotecnologia Animal, Recife, 2020.
1. *Staphylococcus* não-aureus. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Mastite. 4. Citometria. I. Mota, Rinaldo  
Aparecido, orient. II. Souza, Fernando Nogueira de, coorient. III. Título

CDD 636.089

---

# FOLHA DE APROVAÇÃO

Michele Flávia Sousa Marques

Capacidade de diferentes espécies e estirpes de *Staphylococcus* associados a ovinos de resistir à fagocitose e desencadear explosão respiratória por leucócitos polimorfonucleares sanguíneos de ovelhas

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Programa de Pós Graduação em Biociência Animal  
Defesa de Doutorado

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## Banca examinadora

---

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota – Orientador  
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

---

Profa. Dra. Luciana Bignardi Brisola Casimiro da Costa  
Ohio State University

---

Prof. Dr. José Givanildo da Silva  
Departamento de Medicina Veterinária – UFCG

---

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior  
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE

---

Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à Guilherme Santana de Moura meu esposo, amigo, companheiro e maior incentivador; aos meus pais que sempre me motivaram a seguir o caminho dos estudos; à Fernando Nogueira de Souza grande pesquisador, amigo e mentor de todo esse projeto e Rinaldo Aparecido Mota exemplo de orientador, professor e pesquisador, que sempre me acolheu, acreditou e apoiou minha caminhada, desde a seleção.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela inteligência, por me permitir buscar mais conhecimento, por todas as oportunidades e experiências vividas e pela superação de todas os obstáculos; ao programa de Pós-Graduação em Biociência Animal e todos que o compõem, colegas de turma e docentes, os quais foram caminho para a obtenção de mais essa conquista, de mais um passo em minha carreira profissional; à Faculdade de Veterinária e Zootecnia – USP, na pessoa da Professora Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera e toda a família que forma seu grupo de pesquisa, que de braços abertos me acolheram e possibilitaram a execução desta pesquisa;

Ao professor e pesquisador Dr. Sarne De Vlieghe da Universidade de Ghent – Bélgica e seu grupo de pesquisa, que com muito contentamento me recebeu em sua casa e permitiu vivenciar a rotina de seu laboratório; a Professora Dra. Luciana Bignardi Brisola Casimiro da Costa que com muito carinho e esmero me recebeu na sua casa e na Universidade do estado de Ohio – EUA, permitindo vivenciar sua rotina de trabalho, apresentando as realidades locais e regionais, discutindo temas relevantes e como uma amiga sempre dando conselhos valiosos.

A Universidade Federal da Paraíba, em especial ao Campus III-CCHSA, minha casa, agradeço todo incentivo e consentimento para meu desenvolvimento profissional; por fim, mas não menos importante, a minha família e amigos que verdadeiramente torcem, vibram e me apoiam em cada escolha tomada, mesmo muitas vezes não compreendendo o significado e a importância de alguns passos da caminhada, gratidão.

## EPÍGRAFE

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,  
mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser,  
mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

## RESUMO

Objetivou-se neste estudo desafiar leucócitos polimorfonucleares (PMNL) sanguíneos de ovelhas com espécies de *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. sciuri* e *S. devriesi*) isolados de diferentes nichos ecológicos de ovelhas. Para isso, foi coletado sangue de 14 ovelhas da Raça Santa Inês (7 primíparas e 7 multíparas) e 14 ovelhas da raça Lacaune (7 primíparas e 7 multíparas). Avaliamos a viabilidade, a produção intracelular de espécie reativa de oxigênio (ERO) dos PMNL, e a capacidade de resistir à fagocitose opsonizada e não opsonizada dos diferentes isolados de *Staphylococcus* spp. por citometria de fluxo. Inicialmente observamos as possíveis diferenças na viabilidade, nas respostas fagocíticas e na produção intracelular de espécies reativas de oxigênio por PMNL sanguíneos de ovelhas Santa Inês e Lacaune, primíparas e multíparas, desafiados com um isolado de *Staphylococcus aureus*. Posteriormente, avaliamos o comportamento de escape das defesas imunes dos isolados de estafilococos *aureus* e não *aureus*, considerando a fagocitose e a inibição da produção de ERO por PMNL do sangue de ovelhas da raça Santa Inês. Observamos maior intensidade de fagocitose de *S. aureus* por PMNL de ovelhas multíparas e nenhum efeito da paridade sobre a funcionalidade dos PMNL sanguíneos foi encontrado. O comportamento de fagocitose foi diferente entre as raças Santa Inês e Lacaune e a opsonização de *S. aureus* mediada por anticorpos foi associada a uma menor intensidade de fagocitose por ovelhas primíparas. Os PMNL de ovelhas Lacaune levaram a maior média geométrica de intensidade da fluorescência (GMFI) da produção de ERO intracelular quando estimulados com *S. aureus*, sugerindo que uma maior atividade microbicida e/ou inflamação poderia ser desencadeada nessas ovelhas. Nossos resultados mostram que ovelhas multíparas fagocitaram mais que as primíparas e que fagocitaram mais *Staphylococcus* não aureus (SNA) do que *S. aureus*. Entre os isolados de SNA, *Staphylococcus chromogenes* foi o que apresentou maior média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) de fagocitose. Todas as espécies, exceto *S. devriesi* apresentaram maior porcentagem de fagocitose opsonizada do que não opsonizada. Pela primeira vez, demonstramos que ovelhas multíparas fagocitaram mais que ovelhas primíparas, além de observarmos maior intensidade de fagocitose



de *S. chromogenes* por PMNLs de ovelhas. Dessa forma, nosso estudo fornece novos insights sobre a funcionalidade dos PMNLs em ovelhas primíparas e múltiparas, o que poderia afetar sua saúde, junto a outras possíveis variáveis como manejo e condições sanitárias do rebanho.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus não-aureus*, *Staphylococcus aureus*, mastite, citometria.

## ABSTRACT

The aim of this study was to challenge blood polymorphonuclear leukocytes (PMNL) from sheep with *Staphylococcus* species (*S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. sciuri* e *S. Devriesi*) isolated from different ecological niches of sheep. For this, blood was collected from 14 Santa Inês sheep (7 primiparous and 7 multiparous) and 14 Lacaune sheep (7 primiparous and 7 multiparous). We evaluated the viability, the intracellular production of reactive oxygen species (ROS) of PMNL, and the ability to resist opsonized and non-opsonized phagocytosis of the different *Staphylococcus* spp isolates. by flow cytometry. Initially, we observed the possible differences in viability, phagocytic responses and intracellular production of reactive oxygen species by blood PMNL from Santa Inês and Lacaune sheep, primiparous and multiparous, challenged with a *Staphylococcus aureus* isolate. Subsequently, we evaluated the escape behavior of the immune defenses of aureus and non-aureus staphylococcus isolates, considering phagocytosis and the inhibition of ROS production by PMNL from the blood of Santa Inês sheep. We observed a higher intensity of phagocytosis of *S. aureus* by PMNL from multiparous ewes and no effect of parity on the functionality of blood PMNL was found. The phagocytosis behavior was different between the Santa Inês and Lacaune breeds and the antibody mediated *S. aureus* opsonization was associated with a lower intensity of phagocytosis by primiparous sheep. The PMNL of Lacaune ewes led to the highest geometric mean fluorescence intensity (GMFI) of intracellular ROS production when stimulated with *S. aureus*, suggesting that greater microbicidal activity and / or inflammation could be triggered in these ewes. Our results show that multiparous sheep phagocytized more than primiparous ewes and that phagocytized more non-aureus *Staphylococcus* (ANS) than *S. aureus*. Among SNA isolates, *Staphylococcus chromogenes* was the one with the highest geometric mean fluorescence intensity (GMFI) of phagocytosis. All species, except *S. devriesi*, presented a higher percentage of opsonized phagocytosis than non-opsonized. For the first time, we demonstrated that multiparous ewes phagocytosed more than primiparous ewes, in addition to observing a higher intensity of phagocytosis of *S. chromogenes* by sheep PMNLs. Thus, our study provides new insights into the

functionality of PMNLs in primiparous and multiparous ewes, which could affect their health, along with other possible variables such as herd management and health conditions.

**Keywords:** Non-aureus staphylococci, *Staphylococcus aureus*, mastitis, cytometry, sheep.

# SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Lista de figuras .....</b>  | <b>12</b> |
| <b>Lista de abreviaturas e siglas .....</b>  | <b>14</b> |
| <b>1. Introdução.....</b>  | <b>16</b> |
| <b>2. Revisão bibliográfica .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2.1 NEUTRÓFILOS .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>2.2 FAGOCITOSE.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>2.3 ESPÉCIE REATIVA DE OXIGÊNIO (ERO) .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>2.4 ARMADILHA EXTRACELULAR DE NEUTRÓFILOS (NET) .....</b>   | <b>25</b> |
| <b>2.5 APOPTOSE.....</b>   | <b>25</b> |
| <b>2.6 MECANISMOS DE ESCAPE DA RESPOSTA IMUNE POR <i>S. aureus</i>.....</b>  | <b>27</b> |
| <b>Referências .....</b>   | <b>29</b> |
| <b>3. Objetivos.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>3.1 GERAL.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>3.2 ESPECÍFICOS .....</b>   | <b>35</b> |
| <b>Capítulo 1 .....</b>  | <b>36</b> |
| BLOOD POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES RESPONSES AGAINST STAPHYLOCOCCUS<br>AUREUS IN PRIMIPAROUS AND PLURIPAROUS LACAUNE AND SANTA INÊS EWES |           |
| <b>Capítulo 2 .....</b>  | <b>54</b> |
| CAPACIDADE DE DIFERENTES ESPÉCIES ESTAFILOCÓCICAS DE RESISTIR À RESPOSTA<br>IMUNE CELULAR DE OVELHAS SANTA INÊS                          |           |
| <b>4. Considerações finais .....</b>   | <b>77</b> |
| <b>Anexos .....</b>  | <b>79</b> |

## Lista de Figuras

### CAPÍTULO 1

**Figure 1.** Percentage of apoptotic (A; annexin-V FITC+/PI-) and viable (B; annexin-V FITC-/PI-) blood polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) in Santa Inês and Lacaune ewes. Different letters indicate  $P < 0.05$ . .....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

**Figure 2.** Percentage (A) and geometric mean fluorescence intensity (GMFI; B) of unopsonized (NO) and antibody-mediated opsonized (OPS) *S. aureus* phagocytosis by PMNLs in primiparous and pluriparous ewes. Different letters indicate  $P \leq 0.05$ . .....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

**Figure 3.** Percentage (A) and geometric mean fluorescence intensity (GMFI; B) of unopsonized (NO) and antibody-mediated opsonized (OPS) *S. aureus* phagocytosis by PMNLs in Lacaune and Santa Inês ewes. Different letters indicate  $P \leq 0.05$ . .....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

**Figure 4.** Percentage (A) and geometric mean fluorescence intensity (GMFI; B) of unstimulated (UNS) and *S. aureus* stimulated (SA) intracellular reactive oxygen species (ROS) production by PMNLs in primiparous and pluriparous ewes. Different letters indicate  $P \leq 0.05$ . .....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

**Figura 5:** Percentage (A) and geometric mean fluorescence intensity (GMFI; B) of unstimulated (UNS) and *S. aureus* stimulated (SA) intracellular reactive oxygen species (ROS) production by PMNLs in Lacaune and Santa Inês ewes. Different letters indicate  $P < 0,05$ . .....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.6

### CAPÍTULO 2

**Fig. Suplementar 1.** Sobreposição do histograma da citometria de fluxo mostrando a média geométrica da intensidade de fluorescência (FL1-H) de *S. aureus* não marcado (à esquerda, em laranja; média geométrica da intensidade de fluorescência = 1,98) e da marcada com éster succinimidílico da carboxifluoresceína (CFSE) (à direita, em azul; média geométrica da intensidade de fluorescência = 1248). .. ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.2

**Figura 1:** Efeito parto (I e II) e opsonização (III e IV) sob a fagocitose por leucócito polimorfonuclear do sangue de ovelhas. Letras diferentes indicam  $P = 0,0001$ .... ERRO! Indicador não definido.6

**Figura 2:** Média dos quadrados mínimos (+ sem) da média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) e da porcentagem (%) da fagocitose de *Staphylococcus* não aureus (SNA) e *Staphylococcus aureus* por leucócito polimorfonuclear do sangue de ovelhas, considerando os efeitos parto (I e II) e opsonização (III e IV). sem: erro-padrão. Letras diferentes indicam  $p < 0,008$ . ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.7

**Figura 3:** Média dos quadrados mínimos (+ sem) da média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) e da porcentagem (%) de fagocitose de *S. aureus*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. devriesi* e *S. xylosus* por leucócitos polimorfonucleares do sangue de ovelhas. sem: erro-padrão. Letras diferentes indicam  $P < 0,0024$ .....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.8

**Figura 4:** Média dos quadrados mínimos (+ sem) da média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) e da porcentagem (%) de fagocitose de *S. aureus*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. devriesi* e *S. xylosus* por leucócito polimorfonuclear do sangue de ovelhas, considerando o efeito parto (I e II) e a opsonização (III e IV). sem: erro-padrão. Letras diferentes indicam  $P < 0,0006$ .....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.9

**Figura 5:** Média dos quadrados mínimos (+ sem) da média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) e da porcentagem (%) de fagocitose de distintas espécies de estafilococos associadas à ovinos, divididos por seu nicho ecológico, por leucócito polimorfonuclear do sangue de ovelhas. sem: erro-padrão. Letras diferentes indicam  $P < 0,008$ .....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.9

**Figura 6:** Média dos quadrados mínimos (+ sem) da porcentagem (%) da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) por *S. aureus*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. devriesi*, *S. xylosus* e de não estimulado (basal-controle) por leucócito polimorfonuclear do sangue de ovelhas, considerando o efeito parto. sem: erro-padrão. Letras diferentes indicam  $P < 0,0004$ . .....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.0

|

## Lista de Abreviaturas e Siglas

|                        |  |
|------------------------|--|
| $^1\text{O}_2$         | Oxigênio singlete(o)   |
| ANOVA                  | Análise de Variância   |
| Bel-2                  | Proteína antiapoptótica  |
| BHI                    | Infusão de cérebro-coração   |
| CC                     | Subfamília de quimiocina   |
| CD14                   | (do inglês) Cluster of differentiation 14, um co-receptor do TLR4 (Toll-like receptor 4), receptor de lipopolissacarídeo |
| CD 44                  | Glicoproteína transmembrana  |
| CD11b                  | Integrina, receptor para complemento   |
| CD62L                  | L-selectina  |
| CFSE                   | Éster de succinimidilo carboxifluoresceína   |
| CHIPS                  | Proteína inibidora da quimiotaxia de <i>S. aureus</i>  |
| CL                     | Quimioluminescência  |
| $\text{Cl}^-$          | Cloro  |
| Coa                    | Coagulase  |
| CXC                    | Subfamília de quimiocina   |
| CXCL 8                 | Quimiocina (IL-8)  |
| CXCL10                 | Proteína 10 induzida por IFN- $\gamma$   |
| CXCR2                  | Quimiocina   |
| DCFH-DA                | Diacetato de 2', 7" – diclorofluoresceína  |
| DNA                    | Ácido desoxirribonucleico  |
| ERO                    | Espécie reativa de oxigênio  |
| FAZ                    | Receptor de morte da superfície celular  |
| FLIPR-like             | Proteína inibidora de quimioatraentes estafilocócicos  |
| FPRL-1                 | Receptor peptídeo formil tipo 1  |
| GM-CSF                 | Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos   |
| GMFI                   | Média geométrica da intensidade de fluorescência   |
| $\text{H}^+$           | Íon hidrônio   |
| $\text{H}_2\text{O}_2$ | Peróxido de hidrogênio   |
| IFN- $\gamma$          | Interferon-gama  |
| IL-1 $\beta$           | Interleucina 1 beta  |



|                             |  |
|-----------------------------|--|
| IL-6                        | Interleucina 6                                     |
| IL-8                        | Interleucina 8                                     |
| IL-12                       | Interleucina 12                                    |
| IMI                         | Infecção intramamária                              |
| LPS                         | Lipopolissacarídeo                                 |
| LTA                         | Ácido lipoteicóico                                 |
| MALDI                       | <i>Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization</i> |
| MMP-8                       | Metaloproteinase-8                                 |
| MMP-9                       | Metaloproteinase-9                                 |
| MPO                         | Mieloperoxidase                                    |
| NADP                        | Fosfato de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo      |
| NADPH                       | Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato         |
| NAS                         | Non-aureus <i>Staphylococci</i>                    |
| NE                          | Elastase de neutrófilos                            |
| NET                         | Armadilha extracelular de neutrófilos              |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup> | Superóxido   |
| O <sub>2</sub>              | Oxigênio molecular                                 |
| OH•                         | Radical de hidroxila                               |
| PAMP                        | Padrão molecular associado a patógenos             |
| PMN                         | Polimorfonuclear                                   |
| PMNL                        | Leucócito polimorfonuclear                         |
| PSGL-1                      | Ligante 1 da glicoproteína P-selectina             |
| SEIX                        | Enterotoxina estafilocócica X                      |
| SNA                         | <i>Staphylococcus não-aureus</i>                   |
| Spa                         | Proteína de superfície A                           |
| SSL5                        | Proteína estafilocócica do tipo superantígeno 5    |
| TLR-2                       | Receptor toll-like 2                               |
| TNF-α                       | Fator de necrose tumoral-α                         |
| TOF                         | <i>Time of flight</i>                              |
| VWbp                        | Fator von Willebrand                               |

## 1. Introdução

Pouco se sabe sobre a resposta imune celular de ovelhas quando desafiadas por patógenos bacterianos, em especial o *Staphylococcus* spp., importante patógeno causador de processos infecciosos como a mastite, uma das principais doenças que acometem os ovinos. Esta infecção afeta negativamente a produção, seja ela de leite ou carne, e o bem-estar animal. Estudos indicam que *Staphylococcus* spp. são isolados de até 70% dos casos de mastite clínica em ovelhas de produção leiteira (BERGONIER; BERTHELOT, 2003) e até 40% das ovelhas de corte (ARSENAULT *et al.*, 2008).

*Staphylococcus aureus* é um dos agentes etiológicos mais importantes por ser responsável pela maioria dos casos clínicos e pela severidade dos mesmos, apesar do risco de sua incidência em um rebanho ser inferior a 7% em uma lactação (ARSENAULT *et al.*, 2008), e por estar associado ao tipo mais grave da doença, a mastite gangrenosa. Nos casos de mastite subclínica, os agentes etiológicos mais prevalentes em ovinos são *Staphylococcus não-aureus* (SNA), os quais podem causar a forma clínica da doença, além de atuar como reservatório de genes de virulência para outras bactérias como *S. aureus* (ACOSTA *et al.*, 2016).

Em ovelhas da raça Santa Inês, que são destinadas à produção de cordeiros para abate, a incidência da mastite é, ainda, mais importante, pois estes animais apresentam uma alta produção de leite quando comparados com animais de outras raças destinadas à exploração comercial da carne, resultando em acúmulo de leite na glândula mamária. Já para as ovelhas da raça Lacaune têm sua relevância por estarem diretamente relacionadas à produção de leite, ou seja, são animais com potencial explorado para tal finalidade, o que os tornam vulneráveis por estarem próximos aos possíveis fatores de risco inerentes à cadeia de produção, como a rotina de ordenha (MARTA; PIRES, 2016; VERÍSSIMO *et al.*, 2010).

A mastite é uma das principais causas de descarte de ovelhas produtoras de leite. Nos rebanhos, as consequências econômicas da mastite, clínica ou subclínica, incluem perda direta da produção de leite, alteração da qualidade e das propriedades do leite para produção de derivados e custo com profissional especializado para diagnóstico e controle da mastite (VERÍSSIMO *et al.*, 2010).

Por outro lado, a literatura relacionada a ovelhas leiteiras diverge dos resultados encontrados para bovinos leiteiros, principalmente quanto à etiologia e a menor incidência de mastite clínica em relação à mastite subclínica. Em ambas as espécies, os SNA são geralmente os microrganismos mais frequentemente isolados na mastite subclínica. No entanto, os pequenos ruminantes mostram uma resposta mais intensa frente a esses patógenos, com maior frequência de isolamento, presença ou não de sinais clínicos (ACOSTA *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2012).

A mastite como todo processo inflamatório, também aumenta a produção de radicais livres que causam lesões por lipoperoxidação, causando danos às proteínas, células e tecidos (ALBA *et al.*, 2019). Na resposta inflamatória, o sistema imunológico é ativado para eliminar o patógeno. Durante a mastite, é comum observar um expressivo aumento da contagem de células somáticas no leite, principalmente devido ao influxo massivo de leucócitos polimorfonucleares (PMNL) (EZZAT ALNAKIP *et al.*, 2014). A migração de neutrófilos da corrente sanguínea para o tecido da glândula mamária ocorre como resposta a moduladores imunes, principalmente as citocinas pró-inflamatórias do tipo Interleucina (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12) e o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (RIOLLET; RAINARD; POUTREL, 2000; SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROSA, 1997), as quais, dentre outras funções, ativam a capacidade fagocítica dos neutrófilos (BANNERMAN *et al.*, 2004). Contudo, algumas bactérias são capazes de modular a produção de citocinas das células do sistema imunológico da glândula mamária, o que modifica a resposta imune inata do hospedeiro. A interação entre bactérias patogênicas e células do sistema imunológico, epitélio, endotélio e glândula é complexa (EZZAT ALNAKIP *et al.*, 2014).

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são reconhecidos como importante célula do sistema imunológico inato e estão na primeira linha de defesa celular do hospedeiro contra invasões de microrganismos. Comumente identificam e eliminam patógenos de maneira rápida e eficaz, através de uma variedade de mecanismos citotóxicos, modulam a resposta imunológica recrutando outras células imunes e desencadeando cascatas inflamatórias (LODGE *et al.*, 2017). Em ovinos, a porcentagem de neutrófilos pode variar entre 10 – 50% dos leucócitos sanguíneos circulantes (JAIN, 1986).

Em animais sadios, os neutrófilos circulantes são inativos, no entanto, quando há exposição a agentes primários, como a ativação de plaquetas por fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) ou por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), eles se tornam mais responsivos ao recrutamento e aos sinais de ativação. Durante o processo de resposta dos neutrófilos há o aumento da captação de patógenos e execução de mecanismos de morte por meio de quimiotaxia, fagocitose, exocitose granular, produção de espécie reativa de oxigênio (ERO) e liberação de armadilha extracelular de neutrófilos (NET) (LODGE *et al.*, 2017).

Os neutrófilos possuem duas alternativas para eliminar as bactérias: podem atuar extracelular ou intracelularmente. Na via extracelular, estes liberam compostos tóxicos por degranulação, liberando espécies reativas de oxigênio (ERO) ou liberando armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET) (BRINKMANN *et al.*, 2004). Na via intracelular provocam a morte bacteriana dentro do fagolisossomo através de enzimas lipossômicas liberadas dos grânulos e de ERO (FLANNAGAN; COSÍO; GRINSTEIN, 2009).

Os neutrófilos migram para os locais onde há inflamação e infecção pelo processo de quimiotaxia. Eles rolam ao longo das células endoteliais, extravasam atraídos por substâncias sinalizadoras para finalmente reconhecer o patógeno, fagocitar e provocar a morte bacteriana (LODGE *et al.*, 2017). Esse recrutamento de

neutrófilos tem como objetivo primário destruir o patógeno por diversos mecanismos e de forma secundária, preservar a integridade do tecido afetado (PETZL *et al.*, 2008).

O sistema de quimiocinas é complexo e envolvem mais de 50 distintas e 20 receptores acoplados à proteína G (D'AMBROSIO; PANINA-BORDIGNON; SINIGAGLIA, 2003; GANGUR; BIRMINGHAM; THANESVORAKUL, 2002; ONO *et al.*, 2003). Compreende uma superfamília de moléculas de polipeptídeos, classificadas em quatro subfamílias - CXC, CC, CX<sub>3</sub>C e C, onde C representa cisteína e X ou X<sub>3</sub> representa um ou três aminoácidos. Também podem ser representadas pelas letras do alfabeto grego  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , com base na presença de uma cisteína no terminal amino, sendo elas: subfamília  $\alpha$  que possui duas cisteínas separadas por um único aminoácido, designada CXC; a subfamília  $\beta$  que possui duas cisteínas, designada CC; a subfamília  $\gamma$  que possui uma cisteína, designada C e a subfamília  $\delta$  que possui duas cisteínas separadas por três aminoácidos, designada CX<sub>3</sub>C. Para unificar a nomenclatura da quimiocinas, cada subfamília é nomeada com a letra L e um número, por exemplo, IL-8 é o novo nome para CXCL não sendo as subfamílias específicas para as células-alvo (SCHALM'S, 2010).

São distintas de outros quimioatraentes como os componentes do complemento C3a e C5a e o fator de ativação de plaquetas e leucotrieno B<sub>4</sub>. Essas são produzidas constitutivamente ou em resposta a estímulos inflamatórios e regulam a hematopoiese, o tráfego de leucócitos, a angiopoiese, a arquitetura tecidual e a organogênese. Respostas diversas a quimioatraentes só é possível graças à capacidade das células de expressar uma combinação única de receptores de quimiocinas e a complexa rede de sinalização intracelular que pode resultar na estimulação do receptor (SCHALM'S, 2010).

Diversas células do organismo podem expressar quimiocinas, e além dos leucócitos, as células endoteliais, epiteliais e musculares podem expressar quimiocinas e seus receptores. A expressão do receptor varia de acordo com o estágio de diferenciação dos leucócitos e a exposição a estímulos de ativação (SCHMID-SCHÖNBEIN *et al.*, 1980). Quando as quimiocinas se ligam a receptores dos leucócitos, causam a ativação de várias vias de sinalização celular que resulta em polarização e locomoção, através da ativação das moléculas de adesão à

integrina. Essa locomoção dos leucócitos em direção a concentrações mais altas de um determinado quimioatraente é denominada quimiotaxia (SCHALM'S, 2010).

O recrutamento de PMNL do sangue para a glândula mamária é o principal mecanismo no combate a processos infecciosos. No entanto, algumas características tornam o PMNL no leite, um fagócito menos eficaz quando comparado ao do sangue. Além do seu envelhecimento espontâneo (TIAN *et al.*, 2005), no leite, o PMNL ingere glóbulos de gordura e caseína, resultando em grandes vacúolos intracelulares ligados à membrana. Essa internalização da membrana celular leva à perda de pseudópodes e arredondamento celular, havendo, ainda a migração dos grânulos citoplasmáticos que se fundem aos vacúolos formando os fagolisossomos. Essa perda de membrana e de grânulos citoplasmáticos resulta na diminuição da atividade fagocítica e bactericida do PMNL (PAAPE; BANNERMAN; ZHAO, 2003). O PMNL no leite também tem menos reserva de energia na forma de glicogênio armazenado (cerca de 38%) menos que o PMNL do sangue (NEWBOULD, 1973).

Todos os fatores que diminuem a viabilidade do PMNL diminuem também o seu potencial fagocítico. Em cabras, a viabilidade dos neutrófilos no sangue foi de 91,8% e no leite de 70,3%, uma tendência semelhante à das vacas leiteiras, no qual as porcentagens de neutrófilos apoptóticos no leite e no sangue durante a lactação foram de cerca de 35% e 5%, respectivamente (VAN OOSTVELDT *et al.*, 2001). Até o momento, não há na literatura essa informação para ovelhas.

Componentes bacterianos como ácido lipoteicóico (LTA) e lipopolissacarídeo (LPS) atuam como moduladores na dinâmica dos neutrófilos, induzindo as alterações morfológicas que permitirão a execução de suas funções como a efusão de selectinas (CD62L), degranulação, secreção de citocinas e ativação de mecanismos de explosão oxidativa. O LTA também é responsável pela inibição da apoptose, aumentando a vida útil dos neutrófilos, ativando sua degranulação, estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativando o fator nuclear kappa beta, o receptor CD14 e o receptor do tipo *toll 2* (LOTZ *et al.*, 2004; RAINARD *et al.*, 2008).

Neutrófilos ativos secretam uma variedade de citocinas que estão envolvidas principalmente na resposta imune inata e liberam o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1  $\beta$  e IL-6. A liberação dessas citocinas nos locais de inflamação amplifica o

processo inflamatório. Também produzem interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), IL-12 e fator de crescimento transformador- $\beta$ , conhecido por modular a imunidade adaptativa. Secretam as quimiocinas CC e CXC. As quimiocinas CC incluem a proteína inflamatória macrofágica -1 $\alpha$  e -1 $\beta$ , as quimiocinas CXC incluem CXCL8 (IL-8) e CXCL10 (proteína 10 induzida por IFN- $\gamma$ ). Deste modo, os neutrófilos amplificam a resposta inflamatória atraindo mais células inflamatórias para o local (SCHALM'S, 2010).

Após a fagocitose, o neutrófilo sofre alterações constitutivas que o levam a apoptose (BRATTON; HENSON, 2011) e expressar em sua superfície os receptores CD44, sinalizando aos macrófagos que o removam (SWAIN *et al.*, 2015). A rápida apoptose dos neutrófilos após a fagocitose é essencial para a resolução da infecção, visto que alguns patógenos bacterianos conseguem alterar a apoptose normal dos neutrófilos induzida por fagocitose para sobreviver e causar doença (BOUTET *et al.*, 2004; LOTZ *et al.*, 2004; NATHAN, 2006).

## 2.2 Fagocitose

Os neutrófilos caracterizam-se por sua capacidade eficaz de fagocitar que consiste na ingestão de bactérias e outras partículas mediadas por receptor (PEYRON; MARIDONNEAU-PARINI; STEGMANN, 2001; SWAIN *et al.*, 2015). Para que a fagocitose ocorra é necessário o reconhecimento entre as bactérias e os PMNL, que ocorre por componentes do complemento e as imunoglobulinas (PAAPE *et al.*, 2002). Esse processo ocorre com a internalização da partícula após a formação de uma vesícula que passará por um processo gradual de maturação se fundindo aos grânulos, digeridos por enzimas proteolíticas e radicais de oxigênio reativos (SCHALM'S, 2010).

As partículas ou microrganismos alvo sinalizam e ativam os neutrófilos através de suas proteínas de superfície (PAAPE; BANNERMAN; ZHAO, 2003), além de citocinas e quimiocinas liberadas pelos tecidos (SWAIN *et al.*, 2015). Os microrganismos são captados pelo fagossomo e a ligação com o receptor fagocítico inicia a cascata de fosforilação, permitindo a expansão do pseudópode por meio de alterações dinâmicas no citoesqueleto de actina. Com o amadurecimento do fagossomo, adquirem atividade microbicida por fusão de outros componentes,

incluindo grânulos citosólicos que contém proteases abundantes e peptídeos antimicrobianos (LODGE *et al.*, 2017).

Os grânulos citosólicos presentes no fagossomo são classificados pelo seu conteúdo protéico em: I. Grânulos azurofílicos ou primários, II. Grânulos secundários ou específicos e III. Grânulos de gelatinase.

Os Grânulos primários são ricos em mieloperoxidase (MPO), defensinas, serinas e proteases como a elastase de neutrófilos (NE), catepsina G e proteinase 3 (CASCÃO; ROSÁRIO; FONSECA, 2009), tem como mecanismo antibacteriano mais importante a peroxidase que na presença de peróxido de hidrogênio e íons halogenetos destroem as bactérias.

Os grânulos secundários contém lactoferrina abundante e matriz metaloproteinase-8 (MMP-8) (CASCÃO; ROSÁRIO; FONSECA, 2009), são negativos para a peroxidase e não são tão densos quanto os grânulos primários (PAAPE; BANNERMAN; ZHAO, 2003).

Os Grânulos de gelatinase são cheios de metaloproteinase-9 (MMP-9) (CASCÃO; ROSÁRIO; FONSECA, 2009), também são peroxidase negativo, já foram identificados em vacas, cabras e ovelhas, são maiores que os primários e os secundários (BAGGIOLINI *et al.*, 1985), esses grânulos contém lactoferrina, importante devido à afinidade pelo ferro, tornando-o indisponível para as bactérias Gram-negativas que necessitam desse elemento para o crescimento e compostos bactericidas independentes de oxigênio, as defensinas (PAAPE; BANNERMAN; ZHAO, 2003).

Os grânulos específicos e de gelatinase também possuem p22phox e gp91phox, que são subunidades da membrana NADPH oxidase, as quais irão permitir a produção de ERO (CASCÃO; ROSÁRIO; FONSECA, 2009).

Além dos efeitos antimicrobianos, a liberação externa de proteases pode degradar a matriz extracelular, permitindo que os neutrófilos transitem pelos tecidos do hospedeiro, mas que também contribuem para danos teciduais (LODGE *et al.*, 2017).

No local da infecção, os neutrófilos empregam inúmeros mecanismos de captura e morte de microrganismos, apresentando em condições de hipóxia, intensificação das vias de sinalização e a potencialização da fagocitose (WALMSLEY *et al.*, 2006), facilitando a liberação de peptídeos e proteases



antimicrobianas (LODGE *et al.*, 2017), por exemplo: a MMP-9, lactoferrina, NE e MPO de neutrófilos ativos (HOENDERDOS *et al.*, 2016), expressão de opsonina (FCgIIIbR), do complemento (C1qrp e C5aR) (WANG; LIU, 2009), importantes para o reconhecimento e ingestão de patógenos, aumenta também a expressão de FCgR (SIMMS; D'AMICO, 1993) e CD11 (MCGOVERN *et al.*, 2011).

Vários mecanismos antimicrobianos são ativados dentro do fagossomo maduro, os quais são divididos didaticamente em mecanismos dependentes de oxigênio e mecanismos independentes de oxigênio, embora esses mecanismos interajam de maneiras complexas (SCHALM'S, 2010).

Os mecanismos dependentes de oxigênio estão localizados nos grânulos primários, são iniciados pelo processo de fagocitose ou perturbação da membrana celular e dependem de uma nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH) oxidase ligada à membrana, a qual consiste em cinco componentes proteicos essenciais. O complexo NADPH oxidase catalisa a redução do oxigênio molecular em ânion superóxido ( $\text{NADPH} + \text{O}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{H}^+ + \text{O}_2^-$ ), esse rápido consumo de oxigênio foi denominado de “explosão respiratória”. Os ânions superóxido são rapidamente transformados em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e podem, também, ser convertidos em radicais de hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) na presença de metais catalíticos, como o ferro. A mieloperoxidase catalisa a conversão de íons  $\text{H}_2\text{O}_2$  e halogenetos em ácidos hipo-halosos, sendo o ácido hipocloroso o primeiro produzido. Por fim, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  interage com ácidos hipo-halosos para produzir o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), que é uma forma de oxigênio de alta energia com potencial para atacar ligações duplas, interagindo com lipídios insaturados, ligações de carbono, grupos sulfidrila e amino, ácidos nucleicos, nucleotídeos de pirimidina e enzimas dentro de organismos invasores. Para proteger as células dos efeitos nocivos desses oxidantes, existem uma variedade de sistemas antioxidantes que incluem o superóxido dismutase citosólico, a glutatona peroxidase, a glutatona redutase e catalase, os quais convertem radicais de oxigênio em água (SCHALM'S, 2010).

Os mecanismos independentes de oxigênio se baseiam na teoria de que o sistema NADPH oxidase ajusta o pH fagossômico e bombeia elétrons para o vacúolo fagocítico (SEGAL, 2005) e é esse movimento de íons através da membrana do fagossomo que produz as condições favoráveis à morte do organismo, independente de oxigênio (SCHALM'S, 2010).

### 2.3 Espécie Reativa de Oxigênio (ERO)

A produção de ERO pelos neutrófilos desempenha papel fundamental na destruição de patógenos bacterianos e fúngicos através da ativação da cadeia de transporte de elétrons NADPH-oxidase. A NADPH oxidase é um doador de elétrons que reduz o di-oxigênio molecular para formar o ânion superóxido, produzindo uma matriz ERO antimicrobiana (LODGE *et al.*, 2017).

A atividade microbicida de ERO varia de acordo com a espécie bacteriana, à depender do arsenal de mecanismos de escape desses microrganismos, por exemplo, ela contribui significativamente no combate a *Staphylococcus aureus*, no entanto para *Escherichia coli* sua contribuição é menor (ELLSON *et al.*, 2006; MCGOVERN *et al.*, 2011).

Após a ativação do PMNL a partir da ligação dos componentes do complemento e das imunoglobulinas na sua superfície é iniciada a explosão oxidativa, seguida pelo aumento do consumo de oxigênio e da atividade monofosfática hexose (KARNOVSKY; BADWEY, 1986). A estimulação da NADPH-oxidase inicia a atividade da hexose monofosfato. Quando a membrana plasmática do PMNL é agredida, libera grandes quantidades de superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (DULIN; PAAPE; NICKERSON, 1988; MEHRZAD *et al.*, 2001). O  $O_2^-$  e o  $H_2O_2$  formado na superfície celular e na membrana fagossômica interagem e formam radical hidroxila e  $^1O_2$ , componentes chave dos mecanismos de morte dependentes de oxigênio do PMNL (PAAPE; BANNERMAN; ZHAO, 2003).

Quando o fagossomo contém microrganismo com grânulos primários ou azurófilo, a mieloperoxidase é liberada. Esta enzima catalisa a formação do hipoclorito, um agente oxidante de  $Cl^-$  e  $H_2O_2$ . A explosão respiratória pode ser monitorada por avaliar atividade quimioluminescente (CL) do PMNL. Nessa situação, o oxigênio e os metabólitos estão altamente instáveis e eletricamente excitados, essa excitação é acompanhada por emissão de luz ou CL (PAAPE, BANNERMAN, ZHAO, 2003).

## 2.4 Armadilha extracelular de Neutrófilos (NET)

Os neutrófilos ativados podem liberar no espaço extracelular cromatinas descondensadas advindas do seu DNA junto a enzimas e peptídeos antimicrobianos (SCHALM'S, 2010), que formam as NET, ricas em proteases que são responsáveis pelo aprisionamento e morte de patógenos através de um mecanismo não oxidativo (SWAIN *et al.*, 2015). Sua formação é estimulada por mediadores pró-inflamatórios, incluindo o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (BRINKMANN *et al.*, 2004). Essas armadilhas ou redes aderem aos patógenos e facilitam a morte de microrganismos considerados grandes para serem fagocitados (URBAN; LOURIDO; ZYCHLINSKY, 2006). Há indícios de que alguns microrganismos podem utilizar as NET para a formação de biofilmes, provocando danos diretos ao tecido (JUNG *et al.*, 2015).

Após a formação das NET, os neutrófilos sofrem um mecanismo de morte independente da apoptose, conhecido por NET-osis, a qual é dependente da geração de espécies reativas de oxigênio pela NADPH-oxidase (LIPPOLIS *et al.*, 2006). Decorrente dessa dependência de disponibilidade pelo oxigênio molecular, estudos sugerem que em condições de hipóxia a produção de NET seja reduzida, assim como a disponibilidade de ERO (TOHME *et al.*, 2016).

## 2.5 Apoptose

Após a fagocitose, um modo não oxidativo de morte celular é ativado no neutrófilo, provocando a apoptose. Os neutrófilos sofrem apoptose constitutiva, resultando em um curto tempo de sobrevivência. No entanto, a apoptose pode ser atrasada nos locais com presença de inflamação por ambos os sinais do hospedeiro (GM-CSF) e das bactérias (LPS) (HASLETT, 1999).

A apoptose pode ocorrer de duas formas: I. por meio da via extrínseca, quando ocorre a ligação entre os receptores de morte na superfície celular, como FAZ; ou II. através da via intrínseca, acionada pelas mitocôndrias. Estudos microscópicos identificaram poucas mitocôndrias nos neutrófilos, mas com o auxílio de corantes fluorescentes foi possível visualizar uma complexa rede mitocondrial

que controla o destino celular, liberando proteínas pró-apoptóticas como o citocromo c no citosol (MAIANSKI *et al.*, 2004).

A capacidade de uma célula sofrer a apoptose é determinada pelas vias de sinalização pró e anti-apoptótica. A família de proteínas Bcl-2 desempenha papel importante, mediando esses processos. Um mecanismo chave pelo qual essas proteínas mediam a apoptose é através da regulação do citocromo c mitocondrial (ADAMS, 1998; ANTONSSON; MARTINOU, 2000) o qual corresponde a um co-fator na ativação de proteases altamente específicas da família das caspases como a caspase-8, que ativa caspases efetoras, incluindo a caspase-3 e inicia a apoptose (HIRATA *et al.*, 1998). Quando ativadas, as caspases clivam e ativam outros membros da família das caspases levando à amplificação de uma cascata proteolítica, que leva à clivagem de substratos intracelulares, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, contração celular, fragmentação da membrana plasmática, resultando na morte celular (GRANVILLE *et al.*, 1998; REED, 2000).

Os membros da família Bcl-2 promovem a liberação do citocromo c na via pró-apoptótica e restringem o transporte do citocromo c para fora da mitocôndria na via anti-apoptótica (PAAPE; BANNERMAN; ZHAO, 2003).

Das 14 caspases distintas identificadas em mamífero, sete (caspases -1, 3, 4, 7, 8, 9, 10) são expressas em PMNL (SANTOS-BENEIT; MOLLINEDO, 2000). Entre essas sete caspases, a caspase-3 e 8 têm um papel central na mediação da apoptose de PMNL. A apoptose espontânea de um PMNL é temporariamente associada à ativação de ambas as caspases e é atenuado por inibidores específicos da caspase-3 e da caspase-8 (KHWAJA; TATTON, 1999).

Embora o PMNL forneça um efeito benéfico eliminando o agente infeccioso, a exposição prolongada do PMNL no tecido provoca lesão (CAPUCO; PAAPE; NICKERSON, 1986). Um mecanismo pelo qual pode ocorrer a lesão é através da liberação de radicais e proteases tóxicos de oxigênio, agentes que são bactericidas e citotóxicos para o tecido do hospedeiro (LEDBETTER; PAAPE; DOUGLASS, 2001; WARD, 1983). Portanto, a eliminação rápida do PMNL por macrófagos após a neutralização bacteriana e apoptose é essencial para minimizar a lesão inflamatória no hospedeiro, pois a perda da integridade da membrana das células necróticas é acompanhada pela liberação de conteúdos celulares que prejudicam as células

vizinhas e desencadeiam resposta inflamatória (GRANVILLE *et al.*, 1998; REED, 2000).

## **2.6 Mecanismos de escape da resposta imune por *S. aureus***

Para combater o arsenal de mecanismos de defesa apresentado pelos PMNL, os microrganismos bacterianos desenvolvem mecanismos de escape contra essas barreiras imunológicas do hospedeiro. *S. aureus* é conhecido por desafiar a eficácia dos neutrófilos e é bem conhecido por sua capacidade de evitar a fagocitose (FOSTER, 2005; KRAUS; PESCHEL, 2008). Esta bactéria pode expressar vários componentes antiopsônicos na superfície celular, incluindo uma cápsula de polissacarídeo e a proteína de superfície A (*spa*), que permitem às bactérias resistir eficientemente à fagocitose. Esta espécie também possui vários mecanismos que permitem sobreviver dentro das células fagocíticas, incluindo enzimas que neutralizam os radicais livres (FOSTER, 2005).

*S. aureus* possui fatores de virulência para alterar a ativação, quimiotaxia e adesão dos neutrófilos, por exemplo, a proteína inibidora da quimiotaxia de *S. aureus* (CHIPS), uma exoproteína que inibe a migração e a ativação de neutrófilos (HAAS *et al.*, 2004). Outras proteínas inibidoras produzidas por ele são: FLIPR E FLIPR-LIKE que se ligam ao FPRL 1 (Receptor peptídeo formil tipo 1, expresso pelos neutrófilos); staphopain A que impede o recrutamento de neutrófilos induzido por ligantes do CXCR2; A toxina do tipo enterotoxina estafilocócica X (SEIX) e a proteína estafilocócica do tipo superantígeno 5 (SSL5), ambas inibem a ligação do PSGL-1 (ligante 1 da glicoproteína P-selectina) às selectinas (MCGUINNESS; KOBAYASHI; DELEO, 2016).

*S. aureus* também produz vários fatores de virulência que têm como alvo diferentes etapas no sistema de complemento, com inibição da ativação do complemento levando à diminuição da deposição de opsoninas e interrupção da ligação da imunoglobulina a antígenos bacterianos; também produz várias enzimas em resposta aos neutrófilos para degradar e desintoxicar ERO, produz duas coagulases, coagulase a (Coa) e a proteína de ligação ao fator von Willebrand (vWbp) (MCCARTHY; LINDSAY, 2010), ambas se associam à protrombina para gerar estafilotrombina enzimaticamente ativa, que cliva os peptídeos A e B do

fibrinogênio para gerar fibrilas de fibrina (FRIEDRICH *et al.*, 2003). Isso protege *S. aureus* dos fagócitos e contribui para a formação de lesões de abscesso estafilocócico (GUERRA *et al.*, 2017; THAMMAVONGSA *et al.*, 2015).

Com isso em mente, é incontestável que a longa co-evolução entre os microrganismos e as células imunológicas do hospedeiro possa estar envolvida na seleção de bactérias bem adaptadas ao hospedeiro, o que pode estar relacionado ao estabelecimento, gravidade e persistência da infecção, bem como o resultado de possíveis intervenções terapêuticas e de prevenção (HORN *et al.*, 2018; SPAAN *et al.*, 2013).

## Referências

- ACOSTA, A. C.; SILVA, L. B. G.; MEDEIROS, E. S.; PINHEIRO-JÚNIOR, J. W.; MOTA, R. A. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.
- ADAMS, J. M. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. **Science**, [S. l.], v. 281, n. 5381, p. 1322–1326, 1998.
- ALBA, D. F. *et al.* Subclinical mastitis in Lacaune sheep: Causative agents, impacts on milk production, milk quality, oxidative profiles and treatment efficacy of ceftiofur. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 137, p. 103732, 2019.
- ANTONSSON, B.; MARTINOU, J-C. The Bcl-2 Protein Family. **Experimental Cell Research**, [S. l.], v. 256, n. 1, p. 50–57, 2000.
- ARSENAULT, J.; DUBREUIL, P.; HIGGINS, R.; BÉLANGER, D. Risk factors and impacts of clinical and subclinical mastitis in commercial meat-producing sheep flocks in Quebec, Canada. **Preventive Veterinary Medicine**, [S. l.], v. 87, n. 3–4, p. 373–393, 2008.
- BAGGIOLINI, M.; HORISBERGER, U.; GENNARO, R.; DEWALD, B. Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. Ultrastructure of circulating and maturing cells. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 151–8, 1985.
- BANNERMAN, D.; RAWLINS, J. N.; MCHUGH, S.; DEACON, R. M.; YEE, B.; BAST, T.; ZHANG, W. N.; POTHUIZEN, H. H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 273–283, 2004.
- BERGONIER, D.; BERTHELOT, X. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. **Livestock Production Science**, [S. l.], v. 79, n. 1, p. 1–16, 2003.
- BOUTET, P.; BOULANGER, D.; GILLET, L.; VANDERPLASSCHEN, A.; CLOSSET, R.; BUREAU, F.; LEKEUX, P. Delayed Neutrophil Apoptosis in Bovine Subclinical Mastitis. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 87, n. 12, p. 4104–4114, 2004.
- BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 32, n. 8, p. 350–357, 2011.
- BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D.S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, [S. l.], v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.
- CAPUCO, A. V.; PAAPE, M. J.; NICKERSON, S. C. In vitro study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissues of lactating cows. **American journal of veterinary research**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 663–8, 1986.
- CASCÃO, R.; ROSÁRIO, H. S.; FONSECA, J. E. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. **Acta reumatologica portuguesa**, [S. l.], v. 34, n. 2B, p. 313–26, 2009.
- D'AMBROSIO, D.; PANINA-BORDIGNON, P.; SINIGAGLIA, F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 273, n.

1–2, p. 3–13, 2003.

DULIN, A. M.; PAAPE, M. J.; NICKERSON, S. C. Comparison of phagocytosis and chemiluminescence by blood and mammary gland neutrophils from multiparous and nulliparous cows. **American journal of veterinary research**, [S. l.], v. 49, n. 2, p. 172–7, 1988.

ELLSON, C.D.; DAVIDSON, K.; FERGUSON, G. J.; O'CONNOR, R.; STEPHENS, L.R.; HAWKINS, P. T. Neutrophils from p40phox<sup>-/-</sup> mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. **The Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 203, n. 8, p. 1927–1937, 2006.

EZZAT ALNAKIP, M.; QUINTELA-BALUJA, M.; BÖHME, K.; FERNÁNDEZ-NO, I.; CAAMAÑO-ANTELO, S.; CALO-MATA, P.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. **Journal of Veterinary Medicine**, [S. l.], v. 2014, p. 1–31, 2014.

FLANNAGAN, R. S.; COSÍO, G.; GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 355–366, 2009.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. 12, p. 948–958, 2005.

FRIEDRICH, R. *et al.* Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. **Nature**, [S. l.], v. 425, n. 6957, p. 535–539, 2003.

GANGUR, V.; BIRMINGHAM, N. P.; THANESVORAKUL, S. Chemokines in health and disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S. l.], v. 86, n. 3–4, p. 127–136, 2002.

GRANVILLE, D. J.; CARTHY, C. M.; HUNT, D. W.; MCMANUS, B. M. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, [S. l.], v. 78, n. 8, p. 893–913, 1998.

GUERRA, F. E.; BORGOGNA, T. R.; PATEL, D. M.; SWARD, E. W.; VOYICH, J. M. Epic immune battles of history: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. JUN, p. 1–19, 2017.

HAAS, P-J.; DE HAAS, C. J. C.; KLEIBEUKER, W.; POPPELIER, M. J. J. G.; VAN KESSEL, K. P. M.; KRUIJTZER, J. A. W.; LISKAMP, R. M. J.; VAN STRIJP, J. A. G. N-Terminal Residues of the Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* Are Essential for Blocking Formylated Peptide Receptor but Not C5a Receptor. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 173, n. 9, p. 5704–5711, 2004.

HASLETT, CHRISTOPHER. Granulocyte Apoptosis and Its Role in the Resolution and Control of Lung Inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 160, n. supplement\_1, p. S5–S11, 1999.

HIRATA, H.; TAKAHASHI, A.; KOBAYASHI, S.; YONEHARA, S.; SAWAI, H.; OKAZAKI, T.; YAMAMOTO, K.; SASADA, M. Caspases Are Activated in a Branched Protease Cascade and Control Distinct Downstream Processes in Fas-induced Apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 187, n. 4, p. 587–600, 1998.



- HOENDERDOS, K. *et al.* Hypoxia upregulates neutrophil degranulation and potential for tissue injury. **Thorax**, [S. l.], v. 71, n. 11, p. 1030–1038, 2016.
- HORN, J.; STELZNER, K.; RUDEL, T.; FRAUNHOLZ, M. Inside job: Staphylococcus aureus host-pathogen interactions. **International Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 308, n. 6, p. 607–624, 2018.
- JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4th. ed. Philadelphia, PA: Lee and Febiger, 1986.
- JUNG, C. J.; YEH, C. Y.; HSU, R. B.; LEE, C. M.; SHUN, C. T.; CHIA, J. S. Endocarditis Pathogen Promotes Vegetation Formation by Inducing Intravascular Neutrophil Extracellular Traps Through Activated Platelets. **Circulation**, [S. l.], v. 131, n. 6, p. 571–581, 2015.
- KARNOVSKY, M. L.; BADWEY, J. A. Respiratory burst during phagocytosis: An overview. **Methods in Enzymology**, v. 132, p. 353–354, 1986. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687986320196>>.
- KHWAJA, A.; TATTON, L. Caspase-mediated proteolysis and activation of protein kinase Cdelta plays a central role in neutrophil apoptosis. **Blood**, [S. l.], v. 94, n. 1, p. 291–301, 1999.
- KRAUS, D.; PESCHEL, A. Staphylococcus aureus evasion of innate antimicrobial defense. **Future Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 437–451, 2008.
- LEDBETTER, T. K.; PAAPE, M. J.; DOUGLASS, L. W. Cytotoxic effects of peroxyne, polymorphonuclear neutrophils, free-radical scavengers, inhibitors of myeloperoxidase, and inhibitors of nitric oxide synthase on bovine mammary secretory epithelial cells. **American Journal of Veterinary Research**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 286–293, 2001.
- LIPPOLIS, J. D.; REINHARDT, T. A.; GOFF, J. P.; HORST, R. L. Neutrophil extracellular trap formation by bovine neutrophils is not inhibited by milk. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S. l.], v. 113, n. 1–2, p. 248–255, 2006.
- LODGE, K. M.; THOMPSON, A. A. R.; CHILVERS, E. R.; CONDLIFFE, A. M. Hypoxic regulation of neutrophil function and consequences for Staphylococcus aureus infection. **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 166–176, 2017.
- LOTZ, S.; AGA, E.; WILDE, I.; VAN ZANDBERGEN, G.; HARTUNG, T.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 75, n. 3, p. 467–477, 2004.
- MAIANSKI, N. A.; GEISLER, J.; SRINIVASULA, S. M.; ALNEMRI, E. S.; ROOS, D.; KUIJPERS, T. W. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 143–153, 2004.
- MARTA, A.; PIRES, F. **Mastites em pequenos ruminantes. Principais agentes etiológicos**. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, [S. l.], 2016.
- MCCARTHY, A. J.; LINDSAY, J. A. Genetic variation in Staphylococcus aureus surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 173, 2010.

- MCGOVERN, N. N. *et al.* Hypoxia Selectively Inhibits Respiratory Burst Activity and Killing of *Staphylococcus aureus* in Human Neutrophils. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 186, n. 1, p. 453–463, 2011.
- MCGUINNESS, W. A.; KOBAYASHI, Scott D.; DELEO, Frank R. Evasion of neutrophil killing by *Staphylococcus aureus*. **Pathogens**, [S. l.], v. 5, n. 1, 2016.
- MEHRZAD, J.; DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; BURVENICH, C. A comparative study of bovine blood and milk neutrophil functions with luminol-dependent chemiluminescence. **Luminescence**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 343–356, 2001.
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 173–182, 2006.
- NEWBOULD, F. H. The effect of added serum and glucose, and some inherent factors, on phagocytosis in vitro by milk leukocytes from several cows. **Canadian journal of comparative medicine : Revue canadienne de medecine comparee**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 189–94, 1973.
- ONO, S. J.; NAKAMURA, T.; MIYAZAKI, D.; OHBAYASHI, M.; DAWSON, M.; TODA, M. Chemokines: Roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [S. l.], v. 111, n. 6, p. 1185–1199, 2003.
- PAAPE, M.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J.; BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 109–121, 2002.
- PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D.; XIN ZHAO, J-W. L. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 34, n. January, p. 597–627, 2003.
- PETZL, W.; ZERBE, H.; GÜNTHER, J.; YANG, W.; SEYFERT, H-M.; NÜRNBERG, G.; SCHUBERTH, H-J. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 18, 2008.
- PEYRON, P.; MARIDONNEAU-PARINI, I.; STEGMANN, T. Fusion of human neutrophil phagosomes with lysosomes in vitro: Involvement of tyrosine kinases of the Src family and inhibition by mycobacteria. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 276, n. 38, p. 35512–35517, 2001.
- RAINARD, P.; RIOLLET, C.; BERTHON, P.; CUNHA, P.; FROMAGEAU, A.; ROSSIGNOL, C.; GILBERT, F. B. The chemokine CXCL3 is responsible for the constitutive chemotactic activity of bovine milk for neutrophils. **Molecular Immunology**, [S. l.], v. 45, n. 15, p. 4020–4027, 2008.
- REED, J. C. Mechanisms of Apoptosis. **The American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 157, n. 5, p. 1415–1430, 2000.
- RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Kinetics of cells and cytokines during immune-mediated inflammation in the mammary gland of cows systemically immunized with *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin. **Inflammation Research**, [S. l.], v. 49, n. 9, p. 486–496, 2000.
- SANTOS-BENEIT, A. M.; MOLLINEDO, F. Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil

differentiation of HL-60 cells. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 67, n. 5, p. 712–724, 2000.

SCHALM'S. **Veterinary Hematology**. 6 th ed. Ames, Iowa, USA. 2010.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W.; USAMI, S.; SKALAK, R.; CHIEN, S. The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. **Microvascular Research**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 45–70, 1980.

SEGAL, A. W. HOW NEUTROPHILS KILL MICROBES. **Annual Review of Immunology**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 197–223, 2005.

SIMMS, H. H.; D'AMICO, R. Hypoxia Induces an Opsonic Mismatch on the Polymorphonuclear Leukocyte Surface-Reversal via Arg-Gly-Asp-Ser-Mediated Adhesion. **Journal of Surgical Research**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 299–304, 1993.

SORDILLO, L. M.; SHAFER-WEAVER, K.; DEROSA, D. Immunobiology of the Mammary Gland. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 80, n. 8, p. 1851–1865, 1997.

SOUZA, F. N.; BLAGITZ, M. G.; PENNA, C. F. A. M.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; HEINEMANN, M. B.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? **Small Ruminant Research**, [S. l.], v. 107, n. 2–3, p. 65–75, 2012.

SPAAN, A. N.; SUREWAARD, B. G. J.; NIJLAND, R.; VAN STRIJP, J. A. G. Neutrophils Versus Staphylococcus aureus: A Biological Tug of War. **Annual Review of Microbiology**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 629–650, 2013.

SWAIN, D. K.; KUSHWAH, M. S.; KAUR, M.; DANG, A. K. Neutrophil dynamics in the blood and milk of crossbred cows naturally infected with Staphylococcus aureus. **Veterinary World**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 336–345, 2015.

THAMMAVONGSA, V.; KIM, H. K.; MISSIAKAS, D.; SCHNEEWIND, O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. **Nature Reviews Microbiology**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 529–543, 2015.

TIAN, S. Z.; CHANG, C. J.; CHIANG, C. C.; PEH, H. C.; HUANG, M. C.; LEE, J. W.; ZHAO, X. Comparison of morphology, viability, and function between blood and milk neutrophils from peak lactating goats. **Canadian Journal of Veterinary Research**, [S. l.], v. 69, n. 1, p. 39–45, 2005.

TOHME, S. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. **Cancer Research**, [S. l.], v. 76, n. 6, p. 1367–1380, 2016.

URBAN, C. F.; LOURIDO, S.; ZYCHLINSKY, A. How do microbes evade neutrophil killing? **Cellular Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 1687–1696, 2006.

VAN OOSTVELDT, K.; VANGROENWEGHE, F.; DOSOGNE, H.; BURVENICH, C. Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 617–622, 2001.

VERÍSSIMO, C. J.; ZAFALON, L. F.; OTSUK, I. P.; NASSAR, A. F. C. Prejuízos Causados Pela Mastite Em Ovelhas Santa Inês. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S. l.], v. 77, n. 4, p. 583–591, 2010.

WALMSLEY, S. R.; COWBURN, A. S.; CLATWORTHY, M. R.; MORRELL, N. W.;

ROPER, E. C.; SINGLETON, V.; MAXWELL, P.; WHYTE, M. K. B.; CHILVERS, E. R. Neutrophils from patients with heterozygous germline mutations in the von Hippel Lindau protein (pVHL) display delayed apoptosis and enhanced bacterial phagocytosis. **Blood**, [S. l.], v. 108, n. 9, p. 3176–3178, 2006.

WANG, J-S.; LIU, H-C. Systemic hypoxia enhances bactericidal activities of human polymorphonuclear leucocytes. **Clinical Science**, [S. l.], v. 116, n. 11, p. 805–817, 2009.

WARD, P. A. Role of toxic oxygen products from phagocytic cells in tissue injury. **Advances in shock research**, [S. l.], v. 10, p. 27–34, 1983. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6308973>.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Desafiar leucócitos polimorfonucleares (PMNL) sanguíneos de ovelhas com espécies de *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. sciuri* e *S. devriesi*) isolados de diferentes nichos ecológicos de ovelhas.

#### 3.2 Específicos

- Avaliar diferenças na viabilidade, na resposta fagocítica e na produção intracelular de espécies reativas de oxigênio por leucócitos polimorfonucleares sanguíneos de ovelhas Santa Inês e Lacaune, primíparas e múltíparas, desafiadas com *Staphylococcus aureus*.

- Avaliar a resistência à fagocitose e inibição de Espécie Reativa de Oxigênio (ROS) por Leucócitos Polimorfonucleares (PMNL) sanguíneos de ovelhas Santa Inês frente às distintas espécies de *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. chromogenes*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. sciuri*, *S. devriesi*) isolados de diferentes nichos ecológicos.

# CAPÍTULO 1

(Artigo submetido à Small Ruminant Research)

## **Blood polymorphonuclear leukocytes responses against *Staphylococcus aureus* in primiparous and pluriparous Lacaune and Santa Inês ewes**

Michele Flávia Sousa Marques<sup>1,2\*</sup>, Guilherme Santana de Moura<sup>1</sup>, Fernando Nogueira de Souza<sup>3,4</sup>, Ronaldo Gomes Gargano<sup>3</sup>, Kamila Reis Santos<sup>3</sup>, José Augusto Ferronato<sup>3</sup>, Alice Maria Melville Paiva Della Libera<sup>3</sup>, Rinaldo Aparecido Mota<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Doenças Infecciosas, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratório de Caprinocultura e Ovinocultura, Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Bananeiras, 58220-000, Brazil;

<sup>3</sup>Veterinary Clinical Immunology Research Group, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo 05508-270, Brazil;

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal da Paraíba, Areia 58397-000, Brazil.

\*Corresponding author: Michele Flávia Sousa Marques. Email: michele\_flavia4@hotmail.com. Infectious Diseases Laboratory, Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, Recife, PE 52171-900, Brazil.

## **ABSTRACT**

In this study, we evaluated the viability, intracellular production of reactive oxygen species (ROS) and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by blood polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) in primiparous and pluriparous Santa Inês

and Lacaune ewes. Blood was collected from 14 Santa Inês ewes (seven primiparous and seven pluriparous) and 14 Lacaune ewes (seven primiparous and seven pluriparous). The viability of PMNLs, intracellular ROS production, and *S. aureus* phagocytosis were evaluated using flow cytometry. Apart from a higher intensity of *S. aureus* phagocytosis by PMNLs from pluriparous ewes, no effect of parity on the blood PMNLs functionality was found. This finding suggests that pluriparous ewes could be more protected against *S. aureus*, although further field studies are needed. Antibody-mediated opsonization of *S. aureus* was associated with a lower intensity of *S. aureus* phagocytosis in both primiparous and pluriparous ewes, while it had no effect on the percentage of *S. aureus* phagocytosis. The percentage and geometric mean fluorescence intensity (GMFI) of *S. aureus* phagocytosis behaved differently in Lacaune and Santa Inês ewes, which could be explained by breed and farm effects. The intensity of intracellular ROS production by PMNLs when stimulated with *S. aureus* was higher than that of unstimulated basal PMNLs in both primiparous and pluriparous ewes, while no effect on the percentage of PMNLs that produced ROS was observed. Here, the PMNLs from Lacaune ewes led to a higher GMFI of intracellular ROS production when stimulated with *S. aureus*, which suggests that higher microbicidal activity and/or inflammation could be triggered in these ewes. Thus, our study provides novel insights into PMNLs' functionality in primiparous and pluriparous ewes, which could impact their health, although further research is needed to extrapolate conclusions to the field.

*Keywords:* polymorphonuclear neutrophil leukocyte; phagocytosis; bactericidal activity; ewe; *Staphylococcus aureus*.

## 1. INTRODUCTION

Polymorphonuclear neutrophil leukocytes (PMNLs) participate in the early stages of inflammatory processes following a rapid and massive influx of PMNLs from the blood to the infection site shortly after the pathogen enters to the body (Souza et al., 2012). Thus, PMNLs are critical for limiting pathogen survival and dissemination through their ability for phagocytosis and to kill the invading bacteria through oxygen-dependent and -independent mechanisms. In this regard, phagocytic

destruction of engulfed bacteria relies on the production of bactericidal reactive oxygen species (ROS), and ROS can be released extracellularly into the environment at the site of infection or intracellularly in the phagolysosome following phagocytosis of bacteria (Nguyen et al., 2017). Therefore, the intracellular generation of ROS represents part of the main arsenal against invading bacteria (Rinaldi et al., 2007; Rinaldi et al., 2008; Blagitz et al., 2013; Della Libera et al., 2015;).

Although PMNLs provide the first line of defense against invading pathogens (Paape et al., 2003), and variations in susceptibility to infectious diseases, such as mastitis, among sheep breeds and parity have been reported (Larsgard and Vaabenoe, 1993; Bergonier and Berthelot, 2003; Takano et al., 2018), no previous study has investigated the variations in PMNL function on primiparous and pluriparous in dairy- (e.g., Lacaune) and meat-producing (e.g., Santa Inês) ewes, especially against *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* is a primary etiological agent of clinical mastitis in ewes and can account for a large proportion of chronic subclinical intramammary infections (IMIs; Vasileiou et al., 2019). Thus, we sought to explore the viability, intracellular ROS production and phagocytosis of *S. aureus* by PMNLs in primiparous and pluriparous Santa Inês and Lacaune ewes.

## 2. MATERIALS AND METHODS

This research complied with the Ethical Principles in Animal Research and was approved by the Bioethics Commission of the Federal University of Paraíba (Protocol n. 2811270520). Here, 14 Santa Inês ewes (seven primiparous and seven pluriparous) from a research center and 14 Lacaune ewes (seven primiparous and seven pluriparous) from a commercial dairy flock were used. Both farms used a semi-intensive system. The Lacaune and Santa Inês ewes were fed Tifton grass as the roughage supplemented with specific concentrated feed, vitamins, and minerals. Clinical examinations were carried out in all animals, and only clinically healthy ewes at the time of blood sampling were included in the present study. From each ewe, blood samples were collected in sterile BD Vacutainer® tubes containing heparin (8 mL) from each animal for flow cytometric PMNL functions and without anticoagulant (4 mL) to obtain the serum for *S. aureus* opsonization. All samples were tested at the same time under similar conditions.



## 2.1 Bacterial strain and growth conditions

Here, an *S. aureus* strain isolated from a case of ovine clinical mastitis that carried five staphylococcal-enterotoxin-encoding genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, and *see*) and the beta-lactamase-encoding gene (*bla<sub>Z</sub>*) were used. The intracellular production of ROS and phagocytosis assays were evaluated using the bacterium during its late exponential growth phase. First, the isolates were grown on 5% sheep blood agar plates. Then, fresh colonies of each bacterium were grown overnight in brain heart infusion (BHI, cat. n. 1135, ThermoFisher™, U.K.) broth at 37 °C. Subsequently, the staphylococci suspension was diluted at 1:1000 and overnight cultured at 37 °C in fresh BHI broth. Then, the bacteria in the late exponential growth were centrifuged at 2500 ×g for 15 minutes and washed twice with Dulbecco's phosphate buffer (cat. n. 14190185, Gibco, Paisley, U.K.). Afterward, bacteria were resuspended in RPMI-1640 (cat. n. R7638, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, Brazil) and stored at –80 °C for a maximum of 7 d. Before thawing at –80 °C, an aliquot of the bacterial suspension was taken to determine the bacterial concentration (colony forming units mL<sup>-1</sup>) and for 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE)-labeling of *S. aureus* for the phagocytosis assay. *S. aureus* concentration was assessed by culturing the bacterial suspension on BHI agar plates in dilution series. Then, on the day of the experiment, the bacterial concentration was adjusted to the final inoculum dose (1 × 10<sup>9</sup> *S. aureus* mL<sup>-1</sup>) to obtain 1 × 10<sup>7</sup> *S. aureus* mL<sup>-1</sup> per sample.

## 2.2 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE)-labeling of *S. aureus* for phagocytosis assay

To evaluate the phagocytosis assay, the live bacterium was labeled with CFSE, prepared as described by Vander Top et al. (2006). Briefly, the bacteria suspension was incubated at 37 °C for 30 min in the dark with an equal volume of a 2.0 μM solution of CFSE (cat. n. C1157, Invitrogen, USA). Afterward, the bacterial suspensions were centrifuged at 10,000 ×g for 10 minutes and washed three times with Dulbecco's phosphate buffer (cat. n. 14190185, Gibco, Paisley, U.K.), and

further resuspended in RPMI-1640 (cat. n. R7638, Sigma-Aldrich, St. Louis, IL, USA) with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, Brazil), and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for a maximum of 7 d. To ensure that *S. aureus* viability was not affected by CFSE labeling, aliquots of the staphylococci suspensions were serially diluted on BHI agar before and after bacteria labeling and on the day of experiment to check if the viability of the stock solution was not altered. The bacterium labeling in CFSE was confirmed using flow cytometry (Supplementary Figure S1).

### **2.3 *Staphylococcus aureus* opsonization**

First, the autologous blood bovine serum was complement-inactivated by heat treatment (incubation for 30 min at  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Afterward, for antibody-mediated *S. aureus* opsonization, live bacteria were incubated for 20 min at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  with 10% autologous blood bovine complement-inactivated serum (Barrio et al., 2000).

### **2.4 Neutrophil identification**

A conservative gate was created using cell size (forward scatter) and cell granularity (side scatter) characteristics to identify blood PMNLs (Smits et al., 1997; Keogh et al., 2011; Souza et al., 2012).

### **2.5 Intracellular reactive oxygen species production**

The intracellular ROS production was evaluated using 2',7' dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a flow cytometry probe as previously described (Blagitz et al., 2017; Santos et al., 2017), with some modifications. The intracellular ROS by PMNL were measured under unstimulated (basal) and stimulated conditions with unlabeled live *S. aureus*. First, contaminating erythrocytes were eliminated from 100  $\mu\text{L}$  of blood from each sample through hypotonic lysis by adding 1000  $\mu\text{L}$  of 0.2% NaCl for 20 s; then, isotonicity was restored by adding 1000  $\mu\text{L}$  of 1.6% NaCl. The hypotonic lysis step was repeated until complete lysis of erythrocytes was achieved. Subsequently, 1000  $\mu\text{L}$  of PBS was added and centrifugation was performed (400  $\times g$  for 8 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), and the

samples were resuspended in 100  $\mu$ L of PBS. Afterward, blood cells were incubated at 37  $^{\circ}$ C for 30 min with 0.3  $\mu$ M DCFH-DA (cat. n. D6883, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with or without unlabeled live *S. aureus*. Then, 2000  $\mu$ L of ice-cold 3 mM EDTA was added and further centrifugation was performed (400  $\times$  *g* for 8 min at 4 $^{\circ}$ C). The samples were resuspended in 1,000  $\mu$ L of ice-cold PBS, then further centrifuged at 400  $\times$  *g* for 8 min at 4  $^{\circ}$ C; then, the samples were resuspended in 300  $\mu$ L of ice-cold PBS solution containing 1% bovine serum albumin and kept in the dark until analysis. The unstimulated (no bacteria) baseline production of ROS by PMNLs was determined as a negative control. As soon as possible, the sample readings were carried out using a FACSCalibur<sup>TM</sup> flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems<sup>TM</sup>, San Diego, USA) with argon (488 nm excitation) and diode (635 nm excitation) lasers. FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, USA) was used to analyze the data. Data are presented as percentage of PMNLs that produced ROS (percentage of stained cells) and geometric mean fluorescence intensity (GMFI) of PMNLs that produced ROS; the latter provided an accurate measurement of the brightness of stained PMNLs, and was thus an indicator of the intensity of ROS production. The results were corrected for autofluorescence content using unlabeled blood gated PMNLs from the same samples. An example of our gating strategy to measure intracellular ROS production by PMNLs is shown in Supplemental Figure S1.

## 2.6 Phagocytosis Assay

The phagocytosis assay was performed using flow cytometry with CFSE-labeled live *S. aureus* (opsonized and nonopsonized bacteria), as described by Della Libera et al. (2015) and Batista et al. (2018) with some modifications. First, contaminating erythrocytes were eliminated from 100  $\mu$ L of blood from each sample through hypotonic lysis using the method described above. Subsequently, 1000  $\mu$ L of PBS was added and centrifugation was performed (400  $\times$  *g* for 8 min at 4  $^{\circ}$ C); then, the samples were resuspended in 100  $\mu$ L of PBS solution containing 1% bovine serum albumin. Afterward, blood PMNLs were incubated with opsonized or unopsonized CFSE-labeled staphylococci for 30 min at 37  $^{\circ}$ C. Subsequently, 2 mL of ice-cold 3 mM EDTA was added to avoid bacteria adhering to the leukocyte

membrane, which could be mistakenly identified as ingested (Hasui et al., 1989; Rosseau et al., 1997). Then, 1000  $\mu\text{L}$  of ice-cold PBS was added and further centrifugation was performed (400  $\times g$  for 8 min at 4  $^{\circ}\text{C}$ ). The samples were then further centrifuged at 400  $\times g$  for 8 min at 4  $^{\circ}\text{C}$  and the samples were resuspended in 300  $\mu\text{L}$  of ice-cold PBS solution containing 1% bovine serum albumin (BSA) and kept in the dark until analysis. Then, the samples were read using a FACSCalibur<sup>TM</sup> flow cytometer (Becton Dickinson Immunocytometry Systems<sup>TM</sup>, San Diego, USA) with argon (488 nm excitation) and diode (635 nm excitation) lasers. FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, USA) was used to analyze the data. Data are presented as percentage of PMNLs that phagocytosed CFSE-labeled bacteria (percentage of stained cells) and GMFI of PMNLs that phagocytosed bacteria (stained PMNLs); the latter provided an accurate measurement of the brightness of stained cells, and was thus an indicator of the number of bacteria phagocytosed per PMNL. The results were corrected for autofluorescence content using nonlabelled blood gated PMNLs from the same animal. An example of our gating strategy to determine PMNLs' phagocytosis is shown in Supplemental Figure S2.

## **2.7 Detection of apoptosis**

The death of blood PMNLs was assessed using dual labeling with annexin V and propidium iodide (PI; K2350, APOPTEST<sup>TM</sup>-FITC, Dako Cytomation, The Netherlands) and flow cytometry analysis as previously described (Della Libera et al., 2015). First, contaminating erythrocytes were eliminated from 100  $\mu\text{L}$  of blood from each sample through hypotonic lysis using the method described above. Subsequently, 1000  $\mu\text{L}$  of binding buffer (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, and  $\text{CaCl}_2$  1.8 mM) was added and centrifugation was performed (400  $\times g$  for 8 min at 4  $^{\circ}\text{C}$ ); then, the samples were resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of binding buffer containing annexin-V FITC and incubated at room temperature for 20 min in the dark. Immediately before the analysis using flow cytometry, 5  $\mu\text{L}$  of PI was added. The living nonapoptotic PMNLs were negative for both FITC-labeled annexin-V and PI staining. PMNLs that were positive for FITC-labeled annexin-V but negative for PI were classified as early apoptotic. PMNLs that were positive for both labels were identified as late apoptotic. PMNLs that were positive for PI but negative for FITC-

labeled annexin-V were classified as necrotic (Souza et al., 2020). A total of 20,000 cells per sample were examined. FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, USA) was used for data analysis.

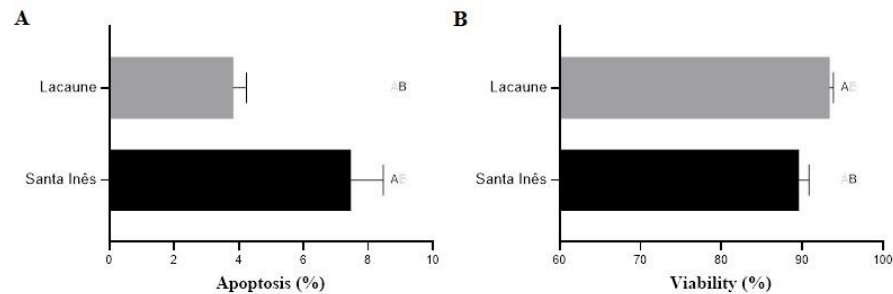
## 2.8 Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the SAS On Demand for Academics software (2020 SAS Institute Inc. [https://www.sas.com/en\\_us/software/on-demand-for-academics.html](https://www.sas.com/en_us/software/on-demand-for-academics.html)). Data normality and homogeneity of variances were verified using the Shapiro-Wilk test and the Levene test, respectively. Data with Gaussian distribution were modeled using the PROC GLM (generalized linear model). We assumed that breed, parity, and the interaction between breed and parity acted as fixed factors. Multiple post hoc analyses of interaction were conducted using the Bonferroni adjusted test. The percentage of ROS production by PMNLs under unstimulated and *S. aureus* stimulated conditions and late apoptosis were evaluated using nonparametric statistics. Comparisons of pairs (breed and parity) were performed using the Mann–Whitney test. Then, the variables were classified according to breed and parity, resulting in four independent groups (primiparous Santa Inês, pluriparous Santa Inês, primiparous Lacaune, and pluriparous Lacaune), which were evaluated using the Kruskal–Wallis test and the Mann–Whitney post hoc test. For multiple analyses, Bonferroni correction was adopted to avoid type I error. SPSS software (version 20, IBM Corporation, Armonk, New York, USA) was used to evaluate the effect of antibody-mediated *S. aureus* opsonization on phagocytosis. The impact of *S. aureus* on the intracellular ROS production by PMNLs was evaluated intragroup using the paired-*t* test or the Wilcoxon test. Results are shown as mean  $\pm$  standard error. Significance was set at  $P \leq 0.05$  unless otherwise indicated.

## 3. RESULTS

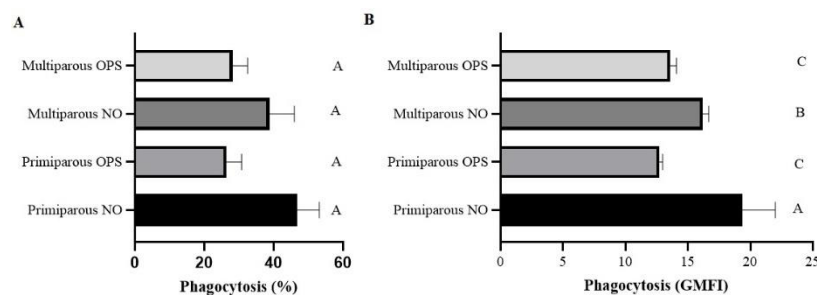
Here, no effect of parity on PMNLs viability was detected (Supplemental Table S1). Nonetheless, a higher percentage of apoptotic PMNLs ( $P = 0.003$ ; Figure 1A)

and lower percentage of viable PMNLs ( $P = 0.01$ , Figure 1B) were found in Santa Inês ewes.



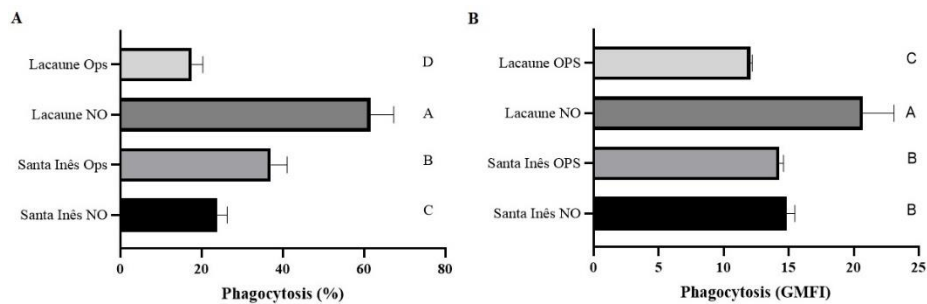
**Figure 1.** Percentage of apoptotic (A; annexin-V FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) and viable (B; annexin-V FITC<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>) blood polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) in Santa Inês and Lacaune ewes. Different letters indicate  $P \leq 0.05$ .

Apart from the effect of parity on the GMFI of *S. aureus* phagocytosis ( $P = 0.009$ ), no impact of parity on the blood PMNLs' functionality was found. In this regard, pluriparous ewes had a higher GMFI of *S. aureus* phagocytosis than primiparous ewes (Figure 2B). Antibody-mediated *S. aureus* opsonization led to lower GMFI of *S. aureus* phagocytosis in both primiparous ( $P = 0.01$ ) and pluriparous ( $P = 0.002$ ) ewes; there was no effect on the percentage of *S. aureus* phagocytosis. A significant interaction for breed and parity was observed in the GMFI of unopsonized ( $P = 0.04$ ) and opsonized ( $P = 0.02$ ) *S. aureus* phagocytosis and the percentage of PMNLs that produced ROS under the *S. aureus*-stimulated condition ( $P = 0.008$ ).



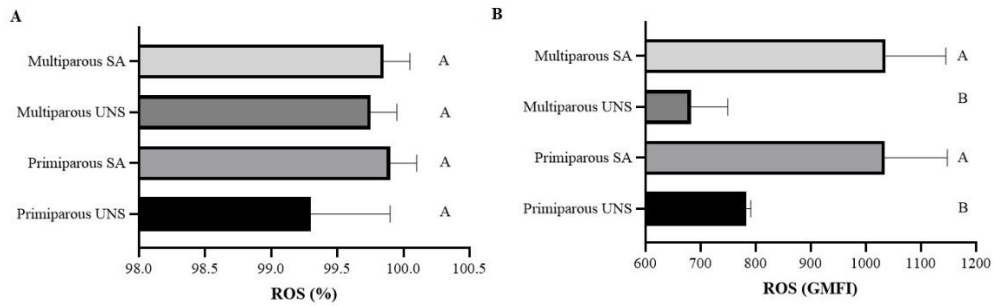
**Figure 2.** Percentage (A) and geometric mean fluorescence intensity (GMFI; B) of unopsonized (NO) and antibody-mediated opsonized (OPS) *S. aureus* phagocytosis by PMNLs in primiparous and pluriparous ewes. Different letters indicate  $P \leq 0.05$ .

The percentage and GMFI of *S. aureus* phagocytosis behaved differently in Lacaune and Santa Inês ewes (Figure 3A). For instance, whereas Lacaune ewes showed a higher percentage ( $P = 0.016$ ) of unopsonized *S. aureus* phagocytosis, Santa Inês ewes displayed a higher percentage ( $P = 0.0001$ ) of opsonized *S. aureus* phagocytosis (Figure 3A). The antibody-mediated *S. aureus* opsonization negatively affected the percentage ( $P = 0.001$ ) and GMFI ( $P = 0.001$ ) of *S. aureus* phagocytosis in Lacaune ewes. In Santa Inês ewes, the antibody-mediated *S. aureus* opsonization led to a higher percentage of *S. aureus* phagocytosis ( $P = 0.027$ ), but no effect on the GMFI *S. aureus* ( $P = 0.25$ ) was observed.



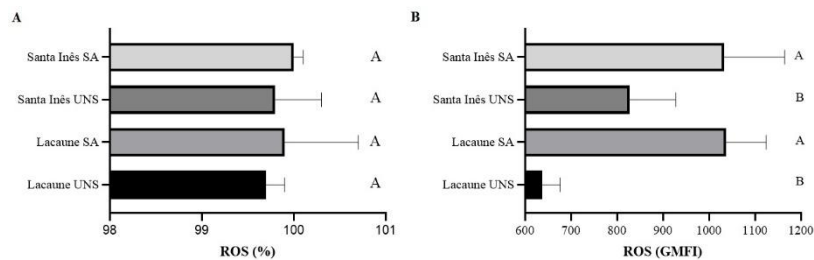
**Figure 3.** Percentage (A) and geometric mean fluorescence intensity (GMFI; B) of unopsonized (NO) and antibody-mediated opsonized (OPS) *S. aureus* phagocytosis by PMNLs in Lacaune and Santa Inês ewes. Different letters indicate  $P \leq 0.05$ .

In the present study, no effect of parity on the intracellular ROS production was found. Therefore, the GMFI of intracellular ROS production by PMNLs when stimulated with *S. aureus* was higher than that of basal unstimulated PMNLs in both primiparous ( $P = 0.01$ ) and pluriparous ( $P = 0.005$ ) ewes (Figure 4). Conversely, there was no significant difference in the percentage of PMNLs that produced ROS between unstimulated control and *S. aureus* stimulated PMNLs in primiparous ( $P = 0.11$ ) and pluriparous ( $P = 0.45$ ) ewes.



**Figure 4.** Percentage (A) and geometric mean fluorescence intensity (GMFI; B) of unstimulated (UNS) and *S. aureus* stimulated (SA) intracellular reactive oxygen species (ROS) production by PMNLs in primiparous and pluriparous ewes. Different letters indicate  $P \leq 0.05$ .

Here, the PMNLs from Lacaune ewes led to a higher GMFI of intracellular ROS production when stimulated with *S. aureus* than those from the Santa Inês ewes ( $P = 0.001$ ; Figure 5), although no effect of breed on the percentage of PMNLs that produced ROS was observed. The percentage of PMNLs that produced ROS when stimulated with *S. aureus* was higher than that of unstimulated control PMNLs that produced ROS in Santa Inês ewes ( $P = 0.015$ ; Figure 5), but no effect on Lacaune ewes ( $P = 0.87$ ) was observed. Nonetheless, the GMFI of intracellular ROS production by PMNLs when stimulated with *S. aureus* was higher than unstimulated basal ones in Lacaune ewes ( $P = 0.001$ ), and the same trend was observed in Santa Inês ewes ( $P = 0.09$ ).



**Figure 5.** Percentage (A) and geometric mean fluorescence intensity (GMFI; B) of unstimulated (UNS) and *S. aureus* stimulated (SA) intracellular reactive oxygen species (ROS) production by PMNLs in Lacaune and Santa Inês ewes. Different letters indicate  $P \leq 0.05$ .



#### 4. DISCUSSION

The viability of PMNLs and their functionality are inextricably connected (Mehrzhad et al., 2004); as such, no effect of parity on the viability of blood PMNLs or on the percentage of PMNLs that phagocytosed *S. aureus* and produced ROS was found. Conversely, although there was no impact of parity on the intensity of ROS production by PMNLs, a higher intensity of unopsonized and antibody-mediated opsonized *S. aureus* phagocytosis in pluriparous ewes was observed. This finding suggested that mid- to end-lactating pluriparous ewes could be more protected against *S. aureus* infections, although further field studies are needed. In this regard, the mammary gland immunity markedly relies on a massive and rapid diapedesis of viable functional PMNLs from blood to the mammary gland, which is crucial for the clearance of invading pathogens and prevention of the establishment of mastitis, as milk-resident PMNLs are less functional than blood PMNLs (Paape et al., 2003). In contrast to our findings, Mehrzhad et al. (2009) reported a pronounced reduction in opsonic *S. aureus* phagocytosis by PMNLs in pluriparous compared to primiparous dairy cows during early lactation. This discrepancy could be intrinsically related to the species and/or to lactation stage (as no ewes in the early lactation period were used here). Sander et al. (2011) reported that the phagocytic activity of PMNLs in pluriparous cows increased from the first parturition until three weeks after parturition, but the same did not occur in primiparous cows. This led to a higher phagocytosis activity of blood PMNLs in the third week after parturition in pluriparous cows when compared to primiparous ones, which is in agreement with our findings in ewes.

Overall, the antibody-mediated *S. aureus* opsonization partially inhibited the intensity of *S. aureus* phagocytosis by PMNLs in both primiparous and pluriparous ewes, although no effect on the percentage of *S. aureus* was found. Although the exact mechanisms need to be further elucidated, blood serum mainly has IgG1. IgG1 could inhibit the opsonic activity of PMNLs (Guidry et al., 1993), whereas IgM and IgG2 are the main opsonizing antibodies for PMNLs (Guidry et al., 1993; Paape et al., 2003).

A lower viability rate of blood PMNLs was observed in Santa Inês ewes; however, we should consider that Lacaune and Santa Inês ewes originated from

different flocks. As a result, breed effect could not be distinguished from farm effect, whereas other factors such as management practices could have affected our findings. A discrepancy in the percentage of antibody-mediated *S. aureus* opsonized and unopsonized phagocytosis between Lacaune and Santa Inês ewes was observed; this could be related to herd effects such as management practices. In this regard, the increase in the percentage of *S. aureus* phagocytosis under the antibody-mediated condition in Santa Inês ewes could reflect the higher circulation of *S. aureus* in this flock, as this herd had a serious mastitis problem as reported by a veterinarian, and consequently lead to the production of *S. aureus*-specific antibodies that promote phagocytosis.

Finally, the PMNLs from Lacaune ewes led to a higher GMFI of intracellular ROS production when stimulated with *S. aureus*, which suggests that higher microbicidal activity and/or inflammation could have been triggered in these ewes. We should also consider that ROS levels can dictate a variety of cellular signaling pathways that mediate pathological processes including inflammation (Dupré-Crochet et al., 2013), which were not specifically measured here.

## **5. CONCLUSIONS**

For the first time, we demonstrated a higher intensity of *S. aureus* phagocytosis by PMNLs from pluriparous compared to primiparous ewes. This could, at least in part, make pluriparous ewes more resistant to *S. aureus* infections. Thus, our study provides novel insights into PMNLs' functionality in primiparous and pluriparous ewes, which could impact their health, although further research is needed to extrapolate conclusions to the field.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the Coordinator for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). AMMPDL, MBH, and RAM are indebted to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their fellowships. FNS and JAF are also grateful to FAPESP for their fellowships (Processes n. 2014/23189-4 and 2018/03685-8).

## REFERENCES

- BARRIO, B., VANGROENWEGHE, F., DOSOGNE, H., BURVENICH, C., 2000. Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime-producing *Staphylococcus aureus* strain. **Vet. Res.** 31, 603–609. <https://doi.org/10.1051/vetres:2000143>
- BATISTA, C.F., SOUZA, F.N., SANTOS, K.R., RAMOS SANCHEZ, E.M., REIS, L.C., BERTAGNON, H.G., BLAGITZ, M.G., GOMES, R.C., LAGE, A.P., HEINEMANN, M.B., DELLA LIBERA, A.M.M.P., 2018. R-Phycoerythrin - labeled *Mannheimia haemolytica* for the simultaneous measurement of phagocytosis and intracellular reactive oxygen species production in bovine blood and bronchoalveolar lavage cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 196, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.12.004>
- BERGONIER, D., BERTHELOT, X., 2003. New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livest. Prod. Sci.* 79, 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(02\)00145-8](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00145-8)
- BLAGITZ, M.G., SOUZA, F.N., BATISTA, C.F., MELVILLE, P.A., LIBERA, A.M.M.P. DELLA, 2013. Clinical findings related to intramammary infections in meat-producing ewes. **Trop. Anim. Health Prod.** 46. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0462-8>
- BLAGITZ, M.G., SOUZA, F.N., BATISTA, C.F., AZEVEDO, L.F.F., SANCHEZ, E.M.R., DINIZ, S.A., SILVA, M.X., HADDAD, J.P., DELLA LIBERA, A.M.M.P., 2017. Immunological implications of bovine leukemia virus infection. **Res. Vet. Sci.** 114, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.012>
- DELLA LIBERA, A.M.M.P., DE SOUZA, F.N., BATISTA, C.F., SANTOS, B.P., DE AZEVEDO, L.F.F., RAMOS SANCHEZ, E.M., DINIZ, S.A., SILVA, M.X., HADDAD, J.P., BLAGITZ, M.G., 2015. Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. **Vet. Res.** 46, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0125-4>
- DUPRÉ-CROCHET, S., ERARD, M., NÜBE, O., 2013. ROS production in phagocytes : why , when , and where ? **J. Leukoc. Biol.** 94, 1–14. <https://doi.org/10.1189/jlb.1012544>
- GUIDRY, A.J., BERNING, L.M., HAMBLETON, C.N., 1993. Opsonization of *Staphylococcus aureus* by Bovine Immunoglobulin Isotypes1. **J. Dairy Sci.** 76, 1285–1289. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77458-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77458-5)
- HASUI, M., HIRABAYASHI, Y., KOBAYASHI, Y., 1989. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **J. Immunol. Methods** 117, 53–58. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90118-x](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90118-x)
- KEOGH, M.J., SPOON, T., RIDGWAY, S.H., JENSEN, E., VAN BONN, W., ROMANO, T.A., 2011. Simultaneous measurement of phagocytosis and respiratory burst of leukocytes in whole blood from bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) utilizing flow cytometry. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 144, 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.017>
- LARSGARD, A.G., VAABENOE, A., 1993. Genetic and environmental causes of variation in mastitis in sheep. **Small Rumin. Res.** 12, 339–347. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(93\)90069-T](https://doi.org/10.1016/0921-4488(93)90069-T)

- MEHRZAD, J., DUCHATEAU, L., BURVENICH, C., 2004. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. **J. Dairy Sci.** 87, 4150–4162. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73558-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73558-4)
- MEHRZAD, J., DUCHATEAU, L., BURVENICH, C., 2009. Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against *Staphylococcus aureus* in primiparous and multiparous cows during early lactation. **Vet. Microbiol.** 134, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.001>
- NGUYEN, G.T., GREEN, E.R., MECSAS, J., 2017. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>
- PAAPE, M.J., BANNERMAN, D.D., ZHAO, X., LEE, J.W., 2003. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. **Vet. Res.** 34, 597–627. <https://doi.org/10.1051/vetres:2003024> 597
- RINALDI, M., MORONI, P., PAAPE, M.J., BANNERMAN, D.D., 2007. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 115, 107–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.09.009>
- RINALDI, M., MORONI, P., PAAPE, M.J., BANNERMAN, D.D., 2008. Differential alterations in the ability of bovine neutrophils to generate extracellular and intracellular reactive oxygen species during the periparturient period. **Vet. J.** 178, 208–213. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.07.030>
- ROSSEAU, S., GUENTHER, A., SEEGER, W., LOHMEYER, J., 1997. Phagocytosis of Viable *Candida albicans* by Alveolar Macrophages: Lack of Opsonin Function of Surfactant Protein A. **J. Infect. Dis.** 175, 421–428. <https://doi.org/10.1093/infdis/175.2.421>
- SANDER, A.K., PIECHOTTA, M., SCHLAMBERGER, G., BOLLWEIN, H., KASKE, M., SIPKA, A., SCHUBERTH, H.J., 2011. Ex vivo phagocytic overall performance of neutrophilic granulocytes and the relation to plasma insulin-like growth factor-I concentrations in dairy cows during the transition period. **J. Dairy Sci.** 94, 1762–1771. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3275>
- SANTOS, B.P., SOUZA, F.N., BLAGITZ, M.G., BATISTA, C.F., BERTAGNON, H.G., DINIZ, S.A., SILVA, M.X., HADDAD, J.P.A., DELLA LIBERA, A.M.M.P., 2017. Blood and milk polymorphonuclear leukocyte and monocyte/macrophage functions in naturally caprine arthritis encephalitis virus infection in dairy goats. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 188, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.04.009>
- SMITS, E., BURVENICH, C., HEYNEMAN, R., 1997. Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 56, 259–269. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(96\)05739-X](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(96)05739-X)
- SOUZA, F.N., BLAGITZ, M.G., PENNA, C.F.A.M., DELLA LIBERA, A.M.M.P., HEINEMANN, M.B., CERQUEIRA, M.M.O.P., 2012. Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? **Small Rumin. Res.** 107, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.04.005>
- TAKANO, P.V., SCAPINI, V.A.C., VALENTINI, T., GIRARDINI, L.K., SOUZA, F.N., DELLA LIBERA, A.M.M.P., HEINEMANN, M.B., CHANDE, C.G., CORTEZ, A.,

COLLE, S.G., BLAGITZ, M.G., 2018. Milk cellularity and intramammary infections in primiparous and multiparous Lacaune ewes during early lactation. **Small Rumin. Res.** 167, 117–122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016>

VANDER TOP, E.A., PERRY, G.A., GENTRY-NIELSEN, M.J., 2006. A novel flow cytometric assay for measurement of in vivo pulmonary neutrophil phagocytosis. **BMC Microbiol.** 6, 61. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-61>

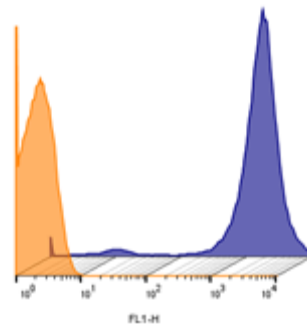
VASILEIOU, N.G.C., CHATZOPOULOS, D.C., SARROU, S., FRAGKOU, I.A., KATSAFADOU, A.I., MAVROGIANNI, V.S., PETINAKI, E., FTHENAKIS, G.C., 2019. Role of staphylococci in mastitis in sheep. **J. Dairy Res.** 86, 254–266. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000591>

## Supplementary Material

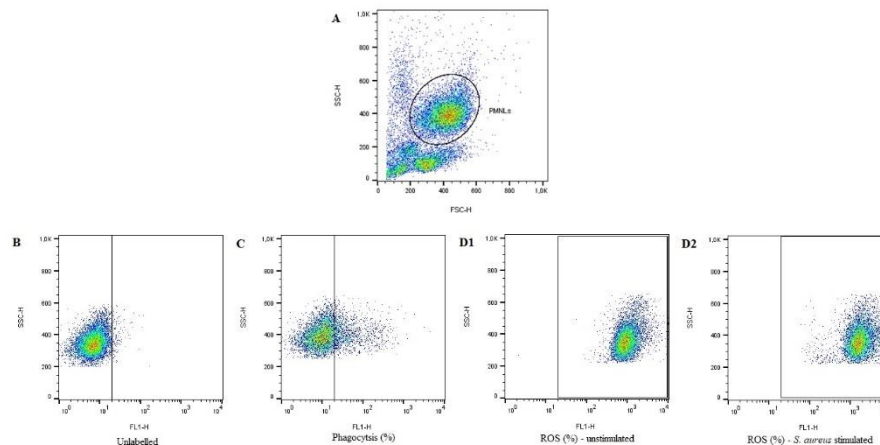
**Supplemental Table S1.** Percentage (mean percentage  $\pm$  standard error) of blood PMNLs viability of primiparous and pluriparous Santa Inês and Lacaune ewes

|  | Primiparous<br>Santa Inês     | Pluriparous<br>Santa Inês     | Primiparous<br>Lacaune        | Pluriparous<br>Lacaune        |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <b>Annexin V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> (%)</b> | 7.84 $\pm$ 1.71 <sup>a</sup>  | 7.11 $\pm$ 1.14 <sup>a</sup>  | 3.41 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>  | 4.26 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>  |
| <b>Annexin V-FITC<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup> (%)</b> | 1.77 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>  | 1.84 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>  | 1.71 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>  | 1.65 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>  |
| <b>Annexin V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup> (%)</b> | 1.06 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>  | 1.11 $\pm$ 0.28 <sup>a</sup>  | 1.33 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>  | 0.85 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>  |
| <b>Annexin V-FITC<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup> (%)</b> | 89.31 $\pm$ 2.12 <sup>b</sup> | 89.92 $\pm$ 1.46 <sup>b</sup> | 93.54 $\pm$ 0.53 <sup>a</sup> | 93.23 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup> |

Different letters among columns indicate  $P \leq 0.05$ .



**Supplementary Figure S1.** Flow cytometry histogram overlay showing the geometric mean fluorescence intensity (FL1-H) of unlabelled (on the left, in orange; geometric mean fluorescence intensity = 1.98) and 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE)-labeled *S. aureus* (on the right, in purple; geometric mean fluorescence intensity = 1,248).



**Supplementary Figure S2.** Successive gating scheme for identifying polymorphonuclear leukocytes (PMNLs) and their viability, intracellular reactive oxygen production, and phagocytosis of *S. aureus*. First, a conservative gate was created using cell size (forward scatter, FSC-H) and cell granularity (side scatter, SSC-H) characteristics to identify blood PMNLs (A) in all flow cytometry tubes intended for phagocytosis of *S. aureus* (C) or intracellular reactive oxygen species (ROS) production (D). First, after gated PMNLs were identified (A), the autofluorescence of PMNLs were determined using unlabelled cells (B). After gated PMNLs were identified (A), the recordings of the side angle light scatter (SSC-H) and fluorescent properties (FL1-H<sup>+</sup>) for 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE) gated PMNLs, which provided information about the percentage of CFSE-labeled *S. aureus* that was phagocytosed (C), and among CFSE<sup>+</sup>-positive PMNLs, the geometric mean fluorescence intensity of *S. aureus* phagocytosis by PMNLs was determined. The 2',7'-

dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) is a cell-permeable, nonfluorescent probe that is converted by ROS to 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in a dose-dependent manner, resulting in a green fluorescence emission that was detected at 500–530 nm (FL1 channel). Here, after gated PMNLs were identified (**A**), the recordings of the side angle light scatter (SSC-H) and fluorescent properties (FL1-H<sup>+</sup>) for DCF<sup>+</sup> gated PMNLs provided information about the percentage of PMNLs that produced ROS under unstimulated (basal; **D1**) and *S. aureus* stimulated (**D2**) conditions, and among DCF<sup>+</sup>-positive PMNLs, the geometric mean fluorescence intensity of ROS production by PMNLs was determined.

## **CAPÍTULO 2**

(Submissão ao periódico Veterinary Research)

### **Capacidade de diferentes espécies estafilocócicas de resistir à resposta imune celular de ovelhas Santa Inês**

Michele Flávia Sousa Marques<sup>1\*</sup>, Guilherme Santana de Moura<sup>1</sup>, Fernando Nogueira de Souza<sup>2,3</sup>, Kamila Reis Santos<sup>2</sup>, José Augusto Ferronato<sup>2</sup>, Alice Maria Melville Paiva Della Libera<sup>2</sup>, Ronaldo Gomes Gargano<sup>2</sup>, Marcos Bryan Heinemann<sup>3</sup>, Rinaldo Aparecido Mota<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Doenças Infecciosas, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brasil;

<sup>2</sup>Veterinary Clinical Immunology Research Group, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo 05508-270, Brasil;

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal da Paraíba, Areia 58397-000, Brasil;

<sup>4</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva 87, São Paulo 05508-270, Brasil.

\*Autor correspondente: Michele Flávia Sousa Marques. E-mail: michele\_flavia4@hotmail.com. Laboratório de Doenças Infecciosas, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, PE 52171-900, Brasil;



## RESUMO

Objetivou-se neste estudo avaliar as variações entre as diferentes espécies de estafilococos, de diferentes nichos ecológicos associados a ovinos de resistir à fagocitose e inibir a atividade de explosão respiratória por leucócitos polimorfonucleares sanguíneos (PMNL) de ovelhas. Foram utilizadas 12 matrizes ovinas, da raça Santa Inês (6 primíparas e 6 múltiparas), no fim de lactação e 25 isolados bacterianos correspondendo a sete espécies de *Staphylococcus* (cinco isolados de *S. aureus*, quatro isolados de *S. haemolyticus*, três isolados de *S. chromogenes*, quatro isolados de *S. simulans*, dois isolados de *S. xylosus*, seis isolados de *S. sciuri* e um isolado de *S. devriesi*) de diferentes nichos ecológicos de ovelhas e borregos (leite – amostras clínica e subclínica, pele de teto das ovelhas e tonsila de borrego) com histórico de coleta simultânea. Para o ensaio de fagocitose, os estafilococos viáveis foram marcados com corante CFSE. A fagocitose opsonizada, não opsonizada e a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) por PMNL foram analisadas por citometria de fluxo. Nossos resultados mostram que ovelhas múltiparas fagocitaram mais que as ovelhas primíparas e que *Staphylococcus* não *aureus* (NAS) foram mais fagocitados do que *S. aureus*. Entre os isolados de NAS, *Staphylococcus chromogenes* foi o que apresentou maior média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) de fagocitose. Todas as espécies, exceto *S. devriesi* apresentaram maior porcentagem de fagocitose opsonizada do que não opsonizada. *S. haemolyticus* foi o patógeno que menos estimulou a produção de ERO, enquanto *S. sciuri* teve maior porcentagem de produção de ERO em ovelhas primíparas. Concluímos que ovelhas múltiparas fagocitaram mais que ovelhas primíparas, assim como, a diversidade na resposta imune entre os isolados bacterianos utilizados, com destaque ao *S. chromogenes* que foi o mais fagocitado e que nenhuma espécie inibiu a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio. Reforçamos assim, a importância de estudos considerando as espécies e suas características para o entendimento das doenças associadas.

**Palavras-chave:** Mastite, *Staphylococcus aureus*, Estafilococos não-aureus, imunidade inata.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the variations between different species of staphylococci, from different ecological niches associated with sheep to resist phagocytosis and inhibit the activity of respiratory explosion by blood polymorphonuclear leukocytes (PMNL) of sheep. Twelve Santa Inês sheep breeders (6 primiparous and 6 multiparous) were used at the end of lactation and 25 bacterial isolates corresponding to seven species of *Staphylococcus* (five isolates of *S. aureus*, four isolates of *S. haemolyticus*, three isolates of *S. chromogenes*, four isolates of *S. simulans*, two isolates of *S. xylosus*, six isolates of *S. sciuri* and one isolate of *S. devriesi*) from different ecological niches of sheep and lambs (milk - clinical and subclinical samples, skin of sheep roof and lamb tonsil) with history of simultaneous collection. For the phagocytosis assay, viable staphylococci were marked with CFSE dye. Opsonized, non-opsonized phagocytosis and intracellular production of reactive oxygen species (ROS) by PMNL were analyzed by flow cytometry. Our results show that multiparous ewes phagocytosed more than primiparous ewes and that *Staphylococcus non-aureus* (NAS) were more phagocytosed than *S. aureus*. Among the NAS isolates, *Staphylococcus chromogenes* was the one with the highest geometric mean fluorescence intensity (GMFI) of phagocytosis. All species, except *S. devriesi*, presented a higher percentage of opsonized phagocytosis than non-opsonized. *S. haemolyticus* was the pathogen that least stimulated the production of ROS, while *S. sciuri* had a higher percentage of ROS production in primiparous sheep. We concluded that multiparous ewes phagocytized more than primiparous ewes, as well as the diversity in the immune response among the bacterial isolates used, with emphasis on *S. chromogenes*, which was the most phagocyte and that no species inhibited the intracellular production of reactive oxygen species. Thus, we reinforce the importance of studies considering the species and their characteristics to understand the associated diseases.

**Keywords:** Mastitis, *Staphylococcus aureus*, Non-aureus staphylococci, innate immunity.

## 1. Introdução

Os leucócitos polimorfonucleares (PMNL) correspondem às células do sistema imune com importante capacidade fagocítica na defesa do organismo animal contra a invasão por patógenos (SCHALM'S, 2010). Deste grupo, os neutrófilos se destacam pela capacidade de identificar e eliminar microrganismos invasores de maneira rápida e eficaz, capazes de modular a resposta imunológica e desencadear cascatas inflamatórias (LODGE *et al.*, 2017). Os neutrófilos eliminam bactérias fagocitadas por meio do mecanismo dependente de oxigênio, liberando compostos tóxicos por degranulação e produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO) que representam o principal arsenal contra bactérias invasoras, e por meio de um mecanismo independente de oxigênio com a produção de peptídeos microbicidas e proteases (BLAGITZ *et al.*, 2013; DELLA LIBERA *et al.*, 2015; RINALDI *et al.*, 2007).

Embora seja claro o conhecimento de que os PMNL formem a primeira linha de defesa celular do hospedeiro contra patógenos causadores da mastite (PAAPE *et al.*, 2003), pouco se sabe sobre as variações entre as distintas espécies e estirpes de estafilococos, especialmente os estafilococos não-aureus (NAS), em sua capacidade de resistir e evadir os PMNL em ovinos. Diante disso, é indiscutível que a longa coevolução entre os microrganismos e as células imunes pode estar envolvida na seleção de microrganismos bem adaptados ao hospedeiro e a determinados nichos ecológicos, o que pode estar relacionado ao estabelecimento, gravidade e persistência da infecção, bem como, podem impactar o resultado de possíveis intervenções terapêuticas e medidas de prevenção (HORN *et al.*, 2018; SPAAN *et al.*, 2013).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* compreendem a principal causa de mastite ovina (BLAGITZ *et al.*, 2012; BLAGITZ *et al.*, 2014; VASILEIOU *et al.*, 2019). Dentre as espécies, *Staphylococcus aureus* é um patógeno com perfil predominantemente contagioso e está associado a forma mais grave de mastite (mastite gangrenosa), representando risco de perda da glândula mamária e à vida da matriz (SANTOS *et al.*, 2007; SEYFFERT *et al.*, 2012). Por outro lado, o grupo diversificado de NAS é o mais comumente isolado de amostras de ovelhas (BLAGITZ *et al.*, 2012; BLAGITZ *et al.*, 2014; VASILEIOU *et al.*, 2019). Estafilococos

não *aureus* compreendem um grande grupo de diferentes espécies de estafilococos, cujas variações na persistência da infecção, resistência antimicrobiana, virulência e comportamento epidemiológico foram relatados (VANDERHAEGHEN *et al.*, 2014). No entanto, pouco se sabe sobre a capacidade das distintas espécies e estirpes de estafilococos em evadir às defesas imunológicas de ovelhas.

Desta forma, objetivou-se avaliar a capacidade de distintas espécies de estafilococos associados a ovinos de resistir à fagocitose e inibir a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio por PMNL sanguíneos de ovelhas da raça Santa Inês primíparas e múltiparas.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Animais e Amostras**

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) sob o nº 2811270520.

Foram coletadas 24 amostras de sangue periférico de 12 matrizes ovinas da raça Santa Inês (6 primíparas e 6 múltiparas) em final de lactação, provenientes de uma instituição de pesquisa e submetidas ao mesmo manejo higiênico-sanitário e nutricional. O sistema de criação era semi-intensivo, com animais a pasto durante o dia e confinados à noite, com suplementação concentrada e mineral no cocho e água *ad libitum*. Todas as ovelhas foram submetidas ao exame clínico e se apresentavam clinicamente sadias no momento da coleta das amostras de sangue.

As amostras de sangue foram coletadas em dois tubos a vácuo (4 mL cada) com heparina e um tubo sem anticoagulante para obtenção do soro de cada ovelha para a pré-opsonização bacteriana.

### **2.2 Isolados bacterianos**

Foram utilizados 25 isolados bacterianos correspondendo a sete espécies de *Staphylococcus* proveniente de diferentes nichos ecológicos de ovelhas e borregos (mastite subclínica - MSC, mastite clínica - MC, pele de teto das ovelhas - P e tonsila

de borrego - T), sendo cinco isolados de *S. aureus* (1 MSC, 2 MC, 1 P, 1T), três de *S. chromogenes* (1 MSC, 1 MC, 1P), um de *S. devriesi* (1 MSC), quatro de *S. haemolyticus* (1 MSC, 1 MC, 1 P, 1 T), seis de *S. sciuri* (3 MSC, 1 C, 1 P, 1 T), quatro de *S. simulans* (1 MSC, 1 MC, 1 P, 1 T) e dois de *S. xylosus* (1 MSC, 1 P), cuja caracterização genotípica está apresentada na Tabela 1. A identificação dos isolados bacterianos foi determinada por espectrometria de massas (MS) com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz – MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization*) e analisador de massas do tipo tempo-de-vôo (TOF; SCHULTHESS *et al.*, 2014).

**Tabela 1:** Lista de isolados bacterianos utilizados para os ensaios de produção intracelular de espécies reativas de oxigênio e fagocitose por PMNL sanguíneos de ovelhas Santa Inês.

| <b>Espécies bacterianas</b> | <b>Nicho</b>       | <b>Genes de virulência</b> | <b>Genes de resistência</b> |
|-----------------------------|--------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>S. aureus</i>            | Ápice de teto      | sea, seb, sed              | -                           |
| <i>S. aureus</i>            | Mastite subclínica | sea, seb, sec              | -                           |
| <i>S. aureus</i>            | Mastite subclínica | -                          | -                           |
| <i>S. aureus</i>            | Mastite clínica    | sea, seb, sec              | blaZ                        |
| <i>S. aureus</i>            | Tonsila de borrego | -                          | -                           |
| <i>S. chromogenes</i>       | Mastite subclínica | -                          | -                           |
| <i>S. chromogenes</i>       | Ápice de teto      | -                          | -                           |
| <i>S. chromogenes</i>       | Mastite clínica    | sea, seb, sec              | blaZ                        |
| <i>S. devriesi</i>          | Mastite subclínica | -                          | -                           |
| <i>S. haemolyticus</i>      | Mastite clínica    | sea, seb, sec              | blaZ                        |
| <i>S. haemolyticus</i>      | Ápice de teto      | sea, seb, sec              | -                           |
| <i>S. haemolyticus</i>      | Tonsila de borrego | sea, seb, sec              | -                           |
| <i>S. haemolyticus</i>      | Mastite subclínica | sea, seb, sec              | -                           |
| <i>S. sciuri</i>            | Mastite subclínica | sea, seb, sec              | -                           |
| <i>S. sciuri</i>            | Tonsila de borrego | sea, seb, see              | blaZ                        |

|                    |                    |               |   |
|--------------------|--------------------|---------------|---|
| <i>S. sciuri</i>   | Mastite subclínica | -             | - |
| <i>S. sciuri</i>   | Mastite clínica    | sea,seb, see  | - |
| <i>S. sciuri</i>   | Ápice de teto      | -             | - |
| <i>S. sciuri</i>   | Mastite subclínica | sec           | - |
| <i>S. simulans</i> | Mastite clínica    | sea, seb, sec | - |
| <i>S. simulans</i> | Tonsila de borrego | -             | - |
| <i>S. simulans</i> | Mastite subclínica | -             | - |
| <i>S. simulans</i> | Ápice de teto      | seb, sec      | - |
| <i>S. xylosus</i>  | Mastite subclínica | -             | - |
| <i>S. xylosus</i>  | Ápice de teto      | -             | - |

### 2.3 Condições de crescimento para ensaio de fagocitose e produção de ERO

O ensaio de fagocitose e produção de ERO foram avaliados usando bactérias marcadas e não marcadas com éster succinimidílico da carboxifluoresceína (CFSE), respectivamente. Primeiro, os isolados foram cultivados em placas de ágar sangue de carneiro a 5%. Em seguida, colônias frescas de cada bactéria foram cultivadas *overnight* em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, cat. n. 1135, ThermoFisher™, Basingstoke, UK) a 37 °C. Subseqüentemente, todos os isolados de estafilococos foram diluídos a 1:1.000 e cultivados *overnight* a 37 °C em caldo BHI. As bactérias foram utilizadas na fase de crescimento exponencial tardio e foram centrifugadas a 2.500 x g por 15 minutos e lavadas duas vezes com tampão de fosfato de Dulbecco (DPBS; cat. n. 14190185, Gibco, Paisley, Reino Unido). Posteriormente, as bactérias foram ressuspensas em RPMI-1640 (cat. n. R7638, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (Cultilab, Campinas, Brasil) e armazenadas a -80 °C por no máximo 7 dias. As suspensões de bactérias foram posteriormente cultivadas em placas de ágar BHI em diluições seriadas e o número de colônias (unidades formadoras de colônias por mL<sup>-1</sup>) foi determinado. Então, 10<sup>7</sup> bactérias não marcadas com CFSE foram adicionadas aos leucócitos sanguíneos para o ensaio de produção intracelular de ROS por PMNL para obter uma multiplicidade de infecção de 25 (MOI = 25). Em seguida, para

garantir a viabilidade bacteriana foi realizada a diluição seriada em ágar BHI da suspensão bacteriana para determinar o número de estafilococos vivos antes do congelamento a -80 °C e após o descongelamento (no dia do experimento).

## **2.4 Marcação das bactérias**

Para a avaliação do ensaio de fagocitose, estafilococos vivos foram marcados com éster succinimidílico da carboxifluoresceína (CFSE) (cat. n. C1157, Invitrogen, Califórnia, EUA) como previamente descrito por Vander Top *et al.* (2006). Resumidamente, a suspensão de bactérias foi incubada a 37 °C por 30 min no escuro com volume igual de uma solução com 2,0 µM de CFSE. Posteriormente, as suspensões de bactérias foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos três vezes com DPBS (cat. n. 14190185, Gibco, Paisley, UK) e ressuspensas em RPMI-1640 (cat. n. R7638, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Cultilab, Campinas, Brasil), e armazenado a -80 °C por no máximo sete dias.

Para garantir que a viabilidade das bactérias não fosse afetada pela marcação bacteriana com CFSE, foi determinada a contagem bacteriana da suspensão de cada estafilococo por diluição seriada em ágar BHI antes e após a marcação das bactérias com CFSE, e no dia do experimento (após descongelamento) para verificar se a viabilidade foi alterada. Para o presente estudo, 10<sup>7</sup> inóculo de bactérias marcadas com CFSE foram adicionados ao sangue para obter MOI de 25. Posteriormente, a marcação com CFSE das bactérias foi confirmada por citometria de fluxo (Figura Suplementar S1).

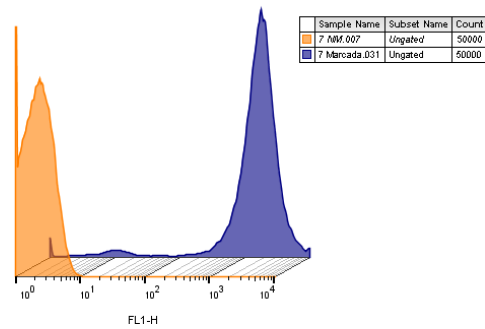


Fig. S1. Sobreposição do histograma da citometria de fluxo mostrando a média geométrica da intensidade de fluorescência (FL1-H) de *S. aureus* não marcado (à esquerda, em laranja; média geométrica da intensidade de fluorescência = 1,98) e da marcada com éster succinimidílico da carboxifluoresceína (CFSE) (à direita, em azul média geométrica da intensidade de fluorescência = 1248).

## 2.5 Pré-opsonização das bactérias

Para obtenção do soro ovino, as amostras de sangue coletadas em tubos a vácuo sem anticoagulante foram centrifugadas a 3400 rpm por 15 min. O sistema complemento do soro ovino autólogo foi inativado por tratamento térmico (incubação por 30 min. a 56°C). Posteriormente, para a opsonização, as bactérias vivas foram incubadas durante 20 min. a 37 °C com 10% de soro autólogo após inativação do sistema complemento (BARRIO *et al.*, 2000).

## 2.6 Identificação de neutrófilos

A população de PMNL do sangue foi identificada por suas características de tamanho celular (dispersão direta) e granularidade celular (dispersão lateral) por meio da citometria de fluxo (SMITS; BURVENICH; HEYNEMAN, 1997; KEOGH *et al.*, 2011; SWAIN *et al.*, 2015)

## 2.7 Produção intracelular de ERO

A produção de ERO intracelular foi avaliada por citometria de fluxo usando o diacetato de 2', 7'' - diclorofluoresceína (DCFH-DA) como sonda (BLAGITZ *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018). Para a avaliação da produção



intracelular de ERO, os PMNL foram estimulados com o estafilococo vivo não marcado com CFSE (aproximadamente na proporção de 25 bactérias por PMNL). Inicialmente, 100 µL de sangue total foi utilizado para lise hipotônica das hemácias, com a adição de 1.000 µL de NaCl 0,2% por 20 s; depois a isotonicidade foi restabelecida com a adição de 1.000 µL de NaCl 1,6%. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 400 g por 8 min, e os leucócitos sanguíneos foram incubados com 200 µL de 0,3 mM DCFH-DA (cat. n. D6883, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) juntamente com estafilococos não marcados por 30 minutos a 37 °C. Logo após, as amostras foram centrifugadas a 400 g por 8 min, e ressuspensas em 300 µL de DPBS.

A produção basal não estimulada (sem bactérias) de ERO por PMNL também foi determinada (controle negativo). Aqui, 20.000 células, excluindo a maioria dos detritos foram avaliadas por amostra. As leituras das amostras foram realizadas utilizando um citômetro de fluxo FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems™, San Diego, EUA) com lasers de argônio (excitação 488 nm) e diodo (excitação 635 nm). O software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, EUA) foi usado para analisar os dados. Os dados são apresentados como porcentagem de PMNL que fagocitaram bactérias marcadas com CFSE (porcentagem de células coradas) e média geométrica de intensidade de fluorescência, a qual fornece uma medição precisa do brilho das células marcadas e é, portanto, um indicador do número de bactérias fagocitadas por PMNL. Os resultados foram corrigidos quanto ao conteúdo de autofluorescência usando células de sangue não marcadas das mesmas amostras.

## **2.8 Ensaio de fagocitose**

O ensaio de fagocitose foi realizado por citometria de fluxo (DELLA LIBERA *et al.*, 2015) usando estafilococos vivos marcados com CFSE (bactérias pré-opsonizadas e não opsonizadas). Inicialmente, 100 µL de sangue total foi utilizado para lise hipotônica das hemácias, com a adição de 1.000 µL de NaCl 0,2% por 20 s; depois a isotonicidade foi restabelecida com a adição de 1.000 µL de NaCl 1,6%. As amostras foram centrifugadas a 400 g por 8 min, e posteriormente os PMNL sanguíneos foram incubados com estafilococos marcados com CFSE

(aproximadamente uma proporção de 25 bactérias por PMNL) pré-opsonizados ou não opsonizados por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 2 mL de EDTA 3 mM, para excluir bactérias aderentes à membrana leucocitária que poderiam ser erroneamente identificadas como ingeridas (BATISTA *et al.*, 2018). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 400 g por 8 min, e as amostras resuspendidas em 300 µL de DPBS. Aqui, 20.000 células, excluindo a maioria dos detritos, foram avaliadas por amostra.

As leituras das amostras foram realizadas utilizando um citômetro de fluxo FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems™, San Diego, EUA) com lasers de argônio (excitação 488 nm) e diodo (excitação 635 nm). O software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, EUA) foi usado para analisar os dados. Os dados são apresentados como porcentagem de PMNL que fagocitaram bactérias marcadas com CFSE (porcentagem de células coradas) e média geométrica de intensidade de fluorescência que fornece uma medição precisa do brilho das células marcadas e é, portanto, um indicador do número de bactérias fagocitadas por PMNL. Os resultados foram corrigidos quanto ao conteúdo de autofluorescência usando células de sangue não marcadas das mesmas amostras.

## **2.9 Análise estatística**

A análise estatística foi conduzida utilizando dois programas estatísticos, o SAS OnDemand (SAS Institute., Cary, NC) e o SPSS (versão 20, IBM. Armonk NY). Inicialmente, a hipótese da normalidade da distribuição dos dados foi verificada por meio de histogramas, gráficos qq-plot e pelo teste de Shapiro-Wilk, ambas as análises revelaram que os dados não apresentavam distribuição Gaussiana. Em seguida as variáveis foram transformadas pelo método logarítmico, e novamente suas distribuições foram avaliadas e as variáveis relacionadas a intensidade da produção de espécies reativas de oxigênio por leucócitos polimorfonucleares assumiram distribuição normal. As outras variáveis passaram por novas transformações, como a da raiz quadrada e do log-neperiano, e não assumiram distribuição Gaussiana e foram avaliadas por meio da estatística não paramétrica. Para a avaliação das variáveis relacionadas a intensidade de produção intracelular de ERO foram confeccionados diferentes modelos para determinar o efeito do

número de partos e características intrínsecas às bactérias (espécie e nicho) sobre a intensidade da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio.

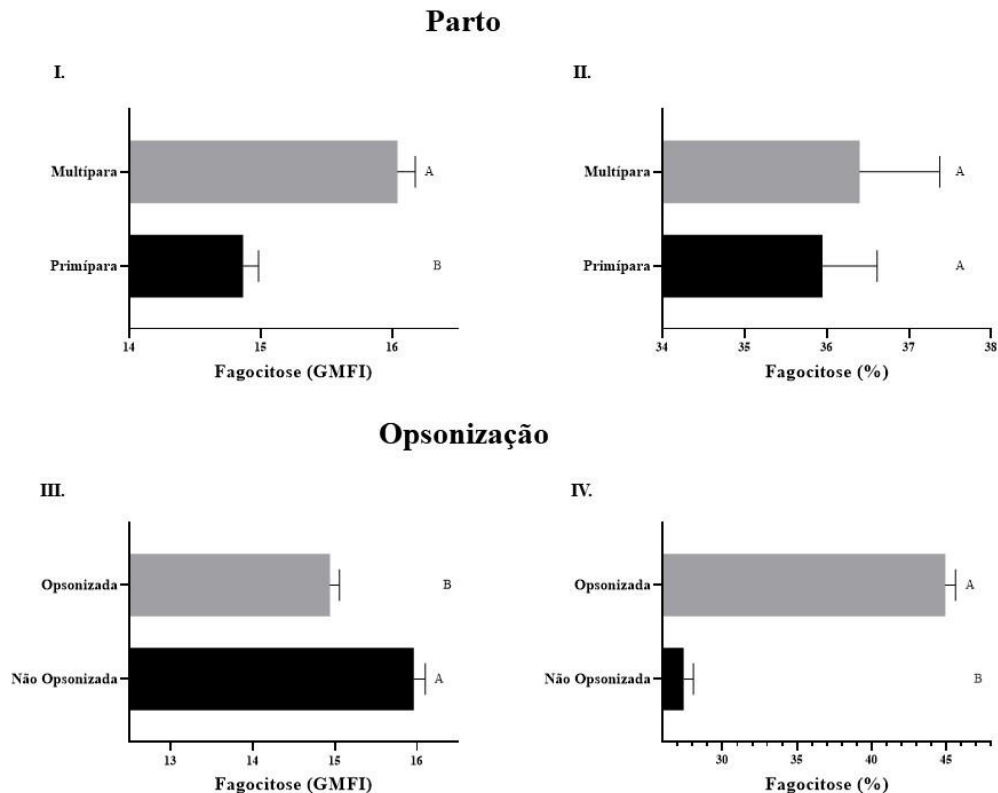
Os modelos foram confeccionados utilizando o *software* SAS OnDemand por meio do PROC GLIMMIX, onde se utilizou a distribuição Log-Normal. O número de partos e as classificações de acordo com as características das bactérias foram considerados efeitos fixos, enquanto os animais foram incluídos como efeito aleatório nos modelos. Para todos os modelos mistos generalizados os critérios de Akaike e Bayesiano, assim como a avaliação gráfica dos resíduos do modelo, foram avaliados. E por fim as comparações pareadas foram verificadas por meio do teste de Tukey-Kramer.

As variáveis relacionadas a fagocitose das distintas espécies e estirpes de estafilococos, assim como a porcentagem de produção intracelular de espécies reativas de oxigênio foram verificadas utilizando estatística não paramétrica utilizando o *software* SPSS. Utilizando essa abordagem verificou-se o efeito do número de partos, opsonização e efeitos inerentes às bactérias. A hipótese do efeito do número de partos, assim como o efeito isolado das bactérias sobre a fagocitose e a produção intracelular de ERO foram verificadas utilizando o teste de Mann-Whitney e para as avaliações de mais de dois grupos de bactérias, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Por outro lado, o efeito da opsonização foi considerado como uma avaliação dependente, visto que as amostras eram oriundas do mesmo animal, então utilizou o teste de Wilcoxon. Além disso, verificou possíveis interações entre o número de partos e bactérias ou a interação entre a opsonização e as bactérias testadas. Para isso foram criadas duas classificações no conjunto de dados relacionadas ao número de partos e as bactérias utilizadas, assim como para a opsonização e bactérias usadas; essa nova classificação permitiu avaliar a interação entre os efeitos fixos do número de partos e bactérias ou opsonização e bactérias.

A interação entre o número de partos e as bactérias utilizadas foi verificada pelo teste de Kruskal-Wallis como *post hoc* o teste de Mann-Whitney. O efeito da interação entre a opsonização e as bactérias utilizadas no estudo foi avaliada pelo teste de Friedman como *post hoc* o teste de Wilcoxon. O método de Bonferroni foi utilizado para corrigir o valor do nível de significância nas múltiplas comparações das avaliações não paramétricas. Para as inferências a significância foi considerada quando  $P \leq 0,05$ .

### 3. Resultados

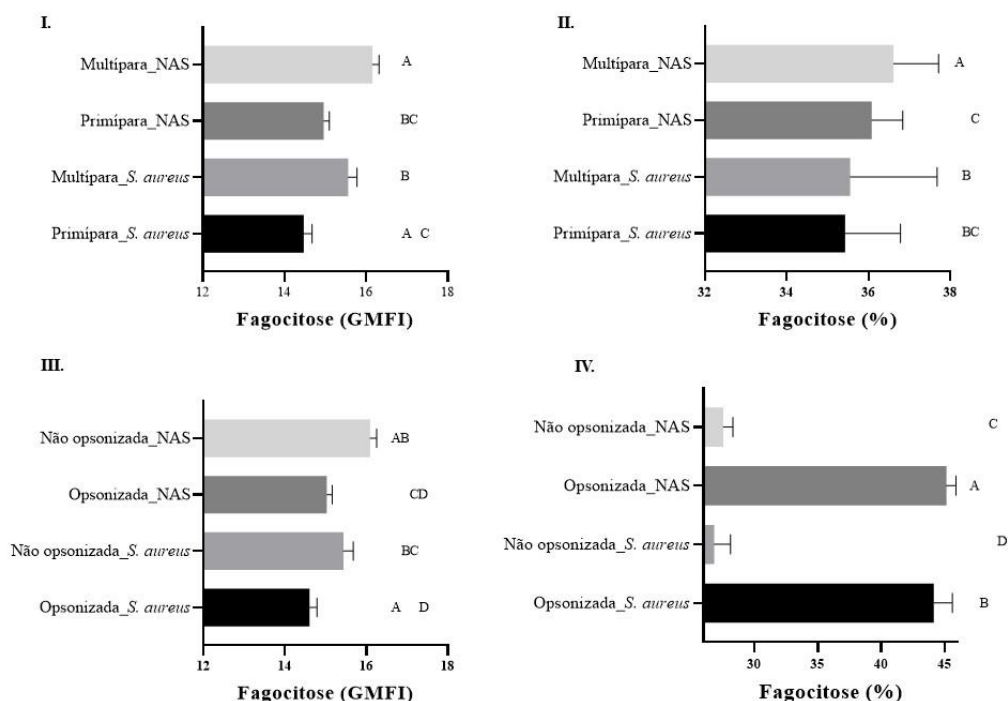
Considerando a média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) percebemos que as ovelhas múltiparas fagocitaram mais que as primíparas, no entanto, essa diferença estatística não foi observada na porcentagem de fagocitose (Figura 1, I - II). Considerando a opsonização, o grupo não opsonizado apresentou maior GMFI de fagocitose do que o opsonizado. Já na média percentual, o opsonizado fagocitou consideravelmente mais que o não opsonizado (Figura 1, III - IV).



**Figura 1:** Efeito parto (I e II) e opsonização (III e IV) sob a fagocitose por leucócito polimorfonuclear do sangue de ovelhas. Letras diferentes indicam  $P = 0,0001$ .

Considerando a fagocitose de *S. aureus* e do grupo NAS percebeu-se que o grupo NAS apresentou maior GMFI e maior porcentagem de fagocitose do que o *S. aureus*, em ovelhas múltiparas. *S. aureus* apresentou maior GMFI de fagocitose em ovelhas múltiparas do que em primíparas, mas percentualmente não houve diferença estatística entre elas (Figura 2, I - II). NAS e *S. aureus* apresentaram maior GMFI no grupo não opsonizado do que no opsonizado, no entanto, observando os

valores percentuais, os grupos opsonizados apresentaram fagocitose muito superior aos não opsonizados, tanto para *S. aureus* quanto para NAS (Figura 2, III - IV).



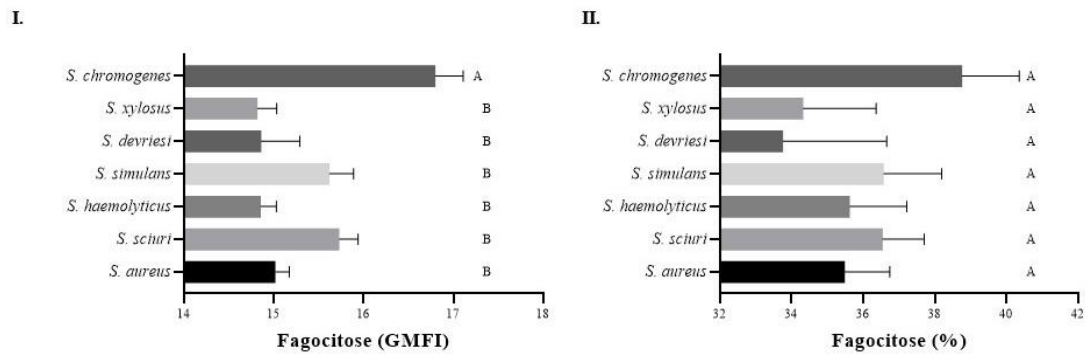
**Figura 2:** Média dos quadrados mínimos ( $\pm$  SEM) da média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) e da porcentagem (%) da fagocitose de *Staphylococcus* não aureus (NAS) e *Staphylococcus aureus* por leucócito polimorfonuclear do sangue de ovelhas, considerando os efeitos parto (I e II) e opsonização (III e IV).

SEM: erro-padrão. Letras diferentes indicam  $P < 0,008$ .

Entre as diferentes espécies estudadas, *S. chromogenes* teve maior GMFI de fagocitose, mas percentualmente nenhuma diferença estatística foi observada entre as espécies bacterianas (Figura 3). Considerando o efeito parto houve diferença estatística entre ovelhas primíparas e múltíparas estimuladas por *S. aureus* e por *S. haemolyticus*, entre as ovelhas primíparas. *S. chromogenes* foi mais fagocitado que *S. aureus*, *S. sciuri* e *S. haemolyticus*, nas ovelhas múltíparas e entre as médias percentuais, nenhuma diferença estatística foi observada (Figura 4, I-II). *S. haemolyticus* e *S. sciuri* tiveram maior GMFI não opsonizada do que opsonizada. *S. chromogenes* opsonizado teve maior GMFI do que *S. aureus*, *S. sciuri* e *S. haemolyticus* opsonizados. Entre os não opsonizados, *S. chromogenes* foi mais fagocitado que *S. aureus* não opsonizado (Figura 4 – III). Considerando as médias percentuais, *S. chromogenes*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri* e *S.*

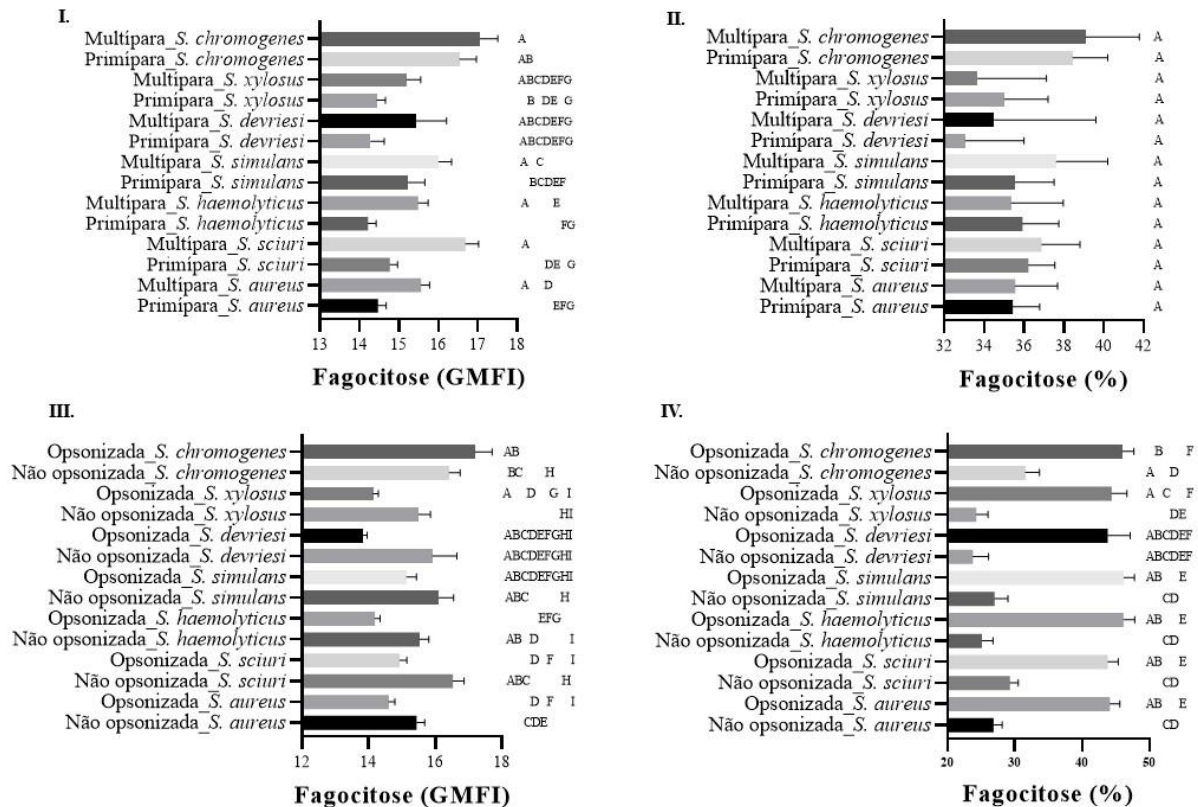
*aureus* tiveram maior fagocitose opsonizada do que não opsonizada. Não houve diferença estatística entre a porcentagem das espécies opsonizadas e não opsonizadas.

A opsonização elevou a porcentagem de fagocitose do *S. sciuri* e *S. haemolyticus* que apresentaram maior GMFI não opsonizada (Figura 4 – IV).



**Figura 3:** Média dos quadrados mínimos ( $\pm$  SEM) da média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) e da porcentagem (%) de fagocitose de *S. aureus*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. devriesti* e *S. xylosois* por leucócitos polimorfonucleares do sangue de ovelhas.

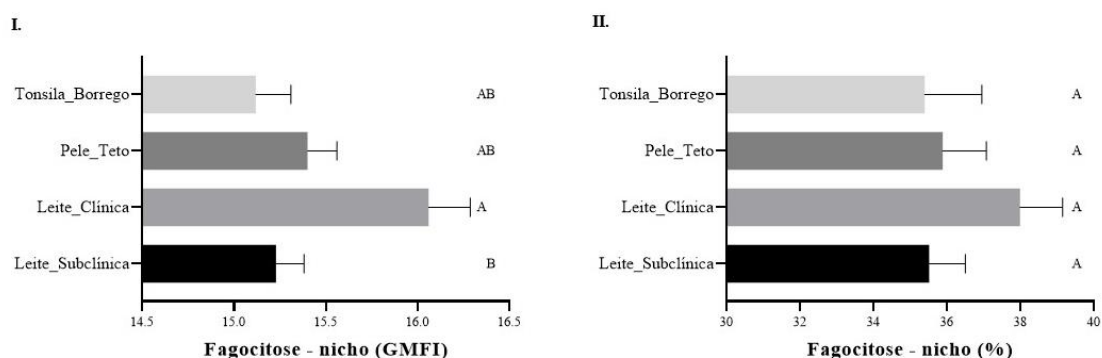
SEM: erro-padrão. Letras diferentes indicam  $P < 0,0024$ .



**Figura 4:** Média dos quadrados mínimos ( $\pm$  SEM) da média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) e da porcentagem (%) de fagocitose de *S. aureus*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. devriesi* e *S. xylosus* por leucócito polimorfonuclear do sangue de ovelhas, considerando o Efeito parto (I e II) e a opsonização (III e IV).

SEM: erro-padrão. Letras diferentes indicam  $P < 0,0006$ .

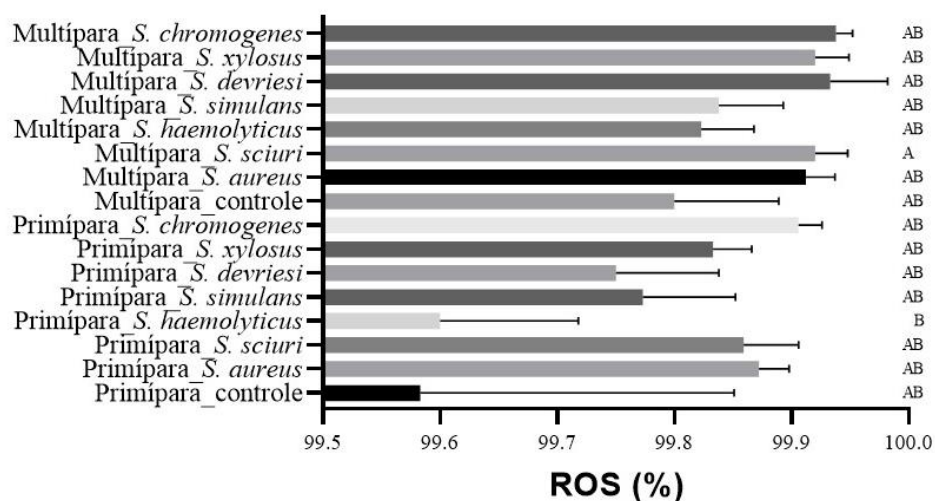
Considerando os nichos ecológicos dos diferentes isolados, aqueles de mastite clínica apresentaram maior GMFI de fagocitose do que os isolados de mastite subclínica (Figura 5 – I), no entanto nenhuma diferença estatística foi observada (Figura 5 – II).



**Figura 5:** Média dos quadrados mínimos ( $\pm$  SEM) da média geométrica da intensidade de fluorescência (GMFI) e da porcentagem (%) de fagocitose de distintas espécies de estafilococos associadas à ovinos, divididos por seu nicho ecológico, por leucócito polimorfonuclear do sangue de ovelhas.

SEM: erro-padrão. Letras diferentes indicam  $P < 0,008$ .

Considerando a produção intracelular de ERO por PMNL do sangue de ovelhas, observou-se diferença estatística para o efeito parto ( $P = 0,012$ ), entre primíparas ( $99.793 \pm 0.030$ ) e múltíparas ( $99.888 \pm 0.014$ ). As ovelhas múltíparas desafiadas com *S. sciuri* produziram uma porcentagem maior de ERO do que as ovelhas primíparas desafiadas com *S. haemolyticus* (Figura 7).



**Figura 6:** Média dos quadrados mínimos ( $\pm$  SEM) da porcentagem (%) da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) por *S. aureus*, *S. sciuri*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. chromogenes*, *S. devriesi*, *S. xyloso* e de não estimulado (basal-controle) por leucócito polimorfonuclear do sangue de ovelhas, considerando o efeito parto

SEM: erro-padrão. Letras diferentes indicam  $P < 0,0004$ .

#### 4. Discussão

Neste estudo, os PMNL sanguíneos de ovelhas múltiparas fagocitaram mais que os PMNL provenientes de ovelhas primíparas, sugerindo que as ovelhas múltiparas são mais eficientes em debelar as infecções por estafilococos, provavelmente por já terem sido desafiadas em algum momento de suas vidas. Em outras circunstâncias, Mehrzad et al. (2009) relataram que a fagocitose de *Staphylococcus aureus* por PMNL em vacas primíparas no período pariparturiente foi substancialmente maior do que em vacas múltiparas, provavelmente por uma resposta mais exacerbada do sistema imune dessas vacas no início da lactação, não podendo afirmar que essa característica se mantém ao longo da lactação.

O mecanismo de fagocitose opsonizada está relacionado à imunidade inata do animal. Esse processo se inicia com a neutralização e fixação de opsoninas pelos neutrófilos na superfície bacteriana que são reconhecidas por receptores específicos (Fc (FcRs) e receptores do complemento (CRs) e desencadeiam o processo fagocítico (VAN KESSEL; BESTEBROER; VAN STRIJP, 2014). Em nosso estudo, os componentes do sistema complemento foram inativados pelo calor e as



imunoglobulinas foram as responsáveis pela característica da resposta opsonizada. Nossos resultados mostraram que a opsonização impactou de forma positiva o percentual de fagocitose de todos os isolados (*S. aureus*, *S. simulans*, *S. xylosum*, *S. chromogenes*, *S. haemolyticus* e *S. sciuri*), exceto *S. devriesei*, que não apresentou imunoglobulinas para caracterizar uma resposta fagocítica específica. Sabe-se que a opsonização não é obrigatória para a ocorrência do processo de fagocitose, no entanto potencializa substancialmente a fagocitose e são dependentes da bactéria alvo (VAN KESSEL; BESTEBROER; VAN STRIJP, 2014), pois está relacionado a um contato prévio com o patógeno que estimulou a produção de células de memória que em nova infecção trará mais rapidez e especificidade de imunoglobulinas à resposta imune do animal (JONG; KESSEL; STRIJP, 2019).

Para combater o arsenal de mecanismos de defesa apresentado pelos PMNL, os microrganismos bacterianos desenvolvem mecanismos de escape contra essas barreiras imunológicas do hospedeiro. *S. aureus* é conhecido por desafiar a eficácia dos neutrófilos e é bem conhecido por sua capacidade de evadir a fagocitose (GUERRA et al., 2017; THAMMAVONGSA et al., 2015). Por isso, estudos anteriores investigaram a capacidade de *S. aureus* associado à mastite em resistir à fagocitose e a morte bacteriana em bovinos (SUTRA; RAINARD; POUTREL, 1990; AARESTRUP; SCOTT; SORDILLO, 1994; BARRIO et al., 2000). No entanto, pouco se sabe sobre essas características relacionadas aos NAS, embora alguns estudos anteriores tenham caracterizado a capacidade desse grupo de bactérias de resistir à fagocitose e à morte bacteriana por fagócitos em humanos (SCHUTZE et al., 1991; SPILIOPOULOU et al., 2012).

Além disto, quando analisamos NAS, como um grupo, estas espécies foram mais fagocitadas que *S. aureus*, indicando que *S. aureus* é mais eficiente em evadir a resposta fagocítica dos PMNL. No entanto, quando consideramos a heterogenidade deste grupo bacteriano, observa-se que *S. chromogenes* foi mais fagocitado por PMNL que *S. aureus*, sugerindo que *S. aureus* e as demais espécies de NAS são capazes de evadir a esta resposta neutrofílica. Neste contexto, quando avaliamos as distintas espécies de NAS e consideramos a variação substancial entre as espécies, como por exemplo, a indução de uma resposta inflamatória mensurada pela contagem de células somáticas (CCS), destacamos que os estafilococos são divididos em novobiocina resistente e sensíveis, e que os

estafilococos sensíveis à novobiocina são considerados patógenos principais, e portanto levam ao maior aumento da CCS. Por outro lado, os estafilococos resistentes à novobiocina são considerados patógenos secundários, entre eles *S. xylosus* e *S. sciuri* (SOUZA *et al.*, 2012). Salientamos que entre NAS resistentes a novobiocina, *S. sciuri* representa uma exceção, pois, mesmo sendo classificado como patógeno secundário, muitas vezes tem a capacidade de causar mastite clínica, aumentar contagem de células somáticas (CCS) e portar vários genes de virulência (CONDAS *et al.*, 2017), apresentando perfil semelhante a *S. aureus* (MOURA, 2020; NEMEGHAIRE *et al.*, 2014).

Portanto, todas as espécies de estafilococos sensíveis à novobiocina, incluindo *S. aureus* foram capazes de evadir à fagocitose por PMNL. Em estudo com bovinos, onde todas as espécies de NAS são considerados patógenos secundários, diferentemente do que ocorre em ovelhas, Souza (2018) avaliou a fagocitose de *S. aureus* e NAS (*S. chromogens*, *S. haemolyticus* e *S. fleurettii*) de bovinos provenientes de diferentes nichos ecológicos por PMNL sanguíneos e não encontrou diferença entre *S. aureus* e NAS – este último como um grupo. Ávall-Jääskeläinen *et al.* (2013) avaliaram a resistência à fagocitose por distintos isolados de NAS provenientes de diferentes nichos ecológicos por macrófagos murinos, e notaram comportamento distinto de *S. aureus* comparado a *S. haemolyticus* e *S. chromogenes*, sendo este último o mais fagocitado, corroborando com nossos achados. Desta forma, destacamos que até o momento não há estudo disponível que tenha investigado a capacidade de NAS associado a ovinos em resistir à fagocitose e ao mecanismo de morte bacteriana por PMNL do sangue de ovelhas.

Também investigamos o efeito do nicho ecológico sobre a resistência a fagocitose e inibição da produção intracelular de ERO por PMNL. Nesse contexto, percebeu-se que os isolados de estafilococos provenientes de casos de mastite clínica foram mais fagocitados do que os isolados de mastite subclínica. Comumente, os patógenos associados à mastite estão sujeitos às pressões da resposta imune, falta de nutrientes (por exemplo, o ferro) e antibióticos, o que pode constituir um desafio ambiental que impulsiona a pressão seletiva para a coevolução adaptativa das bactérias deste nicho ecológico. Por outro lado, as bactérias do ápice do teto e tonsila, por exemplo, são submetidas a pressões distintas, como a competição da microbiota, variado controle do sistema imunológico e exposição

intermitente à baixa concentração de antibióticos (GIULIERI *et al.*, 2018).

Observamos que houve maior fagocitose de estafilococos isolados de casos de mastite clínica por PMNL quando comparados aos isolados de mastite subclínica pode indicar que o processo de fagocitose é fundamental para determinar a severidade da infecção, uma vez que a mastite clínica apresenta um quadro mais severo e muitas vezes autolimitante, sugerindo que a resposta do hospedeiro foi capaz de eliminar a infecção. Por outro lado, a menor intensidade de fagocitose das espécies isoladas de casos de mastite subclínica pode favorecer as IMI persistentes.

Em nosso estudo nenhuma espécie inibiu a produção de ERO, pois todas elevaram a produção a níveis maiores ou semelhantes ao do controle não estimulado. Percebeu-se que *S. haemolyticus* induziu menor produção de ERO quando comparado ao *S. sciuri* que foi o patógeno com maior porcentagem de produção de ERO em ovelhas primíparas, indicando que a produção de ERO pode mediar a resposta inflamatória. De fato, deve-se considerar que os níveis de ROS podem ditar uma variedade de vias de sinalização celular que medeiam processos patológicos, incluindo a inflamação (DUPRÉ-CROCHET; ERARD; NÜBE, 2013).

Nosso estudo demonstrou que a heterogeneidade das espécies de NAS pode impactar a resposta do hospedeiro, que pode estar relacionada com a evasão do processo de fagocitose por PMNL, podendo se refletir no processo inflamatório e na gravidade da infecção.

## **5. Conclusão**

Concluimos que ovelhas multíparas fagocitaram mais que ovelhas primíparas, assim como, a diversidade na resposta imune entre os isolados bacterianos utilizados, com destaque ao *S. chromogenes* que foi o mais fagocitado e que nenhuma espécie inibiu a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio. Reforçamos assim, a importância de estudos considerando as espécies e suas características para o entendimento das doenças associadas.

## Referências

- AARESTRUP, F. M.; SCOTT, N. L.; SORDILLO, L. M. Ability of *Staphylococcus aureus* coagulase genotypes to resist neutrophil bactericidal activity and phagocytosis. **Infection and Immunity**, 1994. v. 62, n. 12, p. 5679–5682.
- ÅVALL-JÄÄSKELÄINEN, S. *et al.* Bovine-associated CNS species resist phagocytosis differently. **BMC Veterinary Research**, 2013. v. 9.
- BARRIO, B. *et al.* Decreased neutrophil bactericidal activity during phagocytosis of a slime-producing *Staphylococcus aureus* strain. **Veterinary Research**, nov. 2000. v. 31, n. 6, p. 603–609. Disponível em: <<http://www.edpsciences.org/10.1051/vetres:2000143>>.
- BATISTA, Camila F. *et al.* R-Phycoerythrin - labeled *Mannheimia haemolytica* for the simultaneous measurement of phagocytosis and intracellular reactive oxygen species production in bovine blood and bronchoalveolar lavage cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, fev. 2018. v. 196, p. 53–59. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242717301903>>.
- BLAGITZ, M. G. *et al.* Function of milk polymorphonuclear neutrophil leukocytes in bovine mammary glands infected with *Corynebacterium bovis*. **Journal of Dairy Science**, 2013. v. 96, n. 6, p. 3750–3757. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6370>>.
- BLAGITZ, M.G. *et al.* Immunological implications of bovine leukemia virus infection. **Research in Veterinary Science**, out. 2017. v. 114, p. 109–116. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528816301825>>.
- CONDAS, L. A. Z. *et al.* Distribution of non- aureus staphylococci species in udder quarters with low and high somatic cell count , and clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, 2017. v. 100, n. 7, p. 5613–5627. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-12479>>.
- COUTINHO, D. A. *et al.* Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, 2006. v. 7, p. 139–151. Disponível em: <<http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/1908>>.
- DUPRÉ-CROCHET, Sophie; ERARD, Marie; NÜBE, Oliver. ROS production in phagocytes : why , when , and where ? **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 94, p. 1–14, 2013. DOI: 10.1189/jlb.1012544.
- EDUARDO LEVI DE SOUSA GUARANÁ, ROGÉRIO ADRIANO DOS SANTOS, ANNE GRACE S. SIQUEIRA CAMPOS, NATÁLIA DA SILVA E SILVA, JOSÉ AUGUSTO BASTOS AFONSO, C. L. De M. Dinâmica celular e microbiológica do leite de ovelhas Santa Inês acompanhadas durante a lactação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2011. v. 31, n. 10, p. 851–858.
- GIULIERI, S. G. *et al.* Genomic exploration of sequential clinical isolates reveals a distinctive molecular signature of persistent *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **Genome Medicine**, 2018. v. 10, n. 65, p. 1–17.
- GUERRA, F. E. *et al.* Epic immune battles of history: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2017. v. 7, n. JUN, p. 1–

19.

HORN, J. *et al.* Inside job: Staphylococcus aureus host-pathogen interactions. **International Journal of Medical Microbiology**, 2018. v. 308, n. 6, p. 607–624. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.11.009>>.

JONG, N. W. M. D. E.; KESSEL, K. O. K. P. M. V. A. N.; STRIJP, J. O. S. A. G. V. A. N. Immune Evasion by Staphylococcus aureus. **Microbiol Spectrum**, 2019. v. 7, n. 2, p. 1–27.

KESSEL, K. P. M. VAN; BESTEBROER, J.; STRIJP, J. A. G. VAN. Neutrophil-mediated phagocytosis of Staphylococcus aureus. **Frontiers in Immunology**, 2014. v. 5, n. SEP, p. 1–12.

LIBERA, Alice Maria Melville Paiva DELLA *et al.* Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. **Veterinary Research**, 2015. v. 46, n. 1, p. 1–8.

LODGE, K. M. *et al.* Hypoxic regulation of neutrophil function and consequences for Staphylococcus aureus infection. **Microbes and Infection**, 2017. v. 19, n. 3, p. 166–176. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2016.10.005>>.

MAX J. PAAPE, DOUGLAS D. BANNERMAN, XIN ZHAO, J.-W. L. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, 2003. v. 34, n. January, p. 597–627.

MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. Phagocytic and bactericidal activity of blood and milk-resident neutrophils against Staphylococcus aureus in primiparous and multiparous cows during early lactation. **Veterinary Microbiology**, 2009. v. 134, n. 1–2, p. 106–112.

MILLET EVANGELISTA DOS SANTOS, A. P. *et al.* Neospora caninum in the Parana State, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, 2006. v. 27, n. 1, p. 111–113.

NEMEGHAIRE, Stéphanie; ARGUDI, M. Angeles; FESSLER, Andrea T.; HAUSCHILD, Tomasz; SCHWARZ, Stefan; BUTAYE, Patrick. The ecological importance of the Staphylococcus sciuri species group as a reservoir for resistance and virulence genes. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 171, n. 3–4, p. 342–356, 2014. DOI: 10.1016/j.vetmic.2014.02.005.

PEREIRA, P. F. V. *et al.* Fatores de risco, etiologia e aspectos clínicos da mastite em ovelhas de corte no Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2014. v. 34, n. 1, p. 1–10. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2014000100001&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014000100001&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>.

RINALDI, M. *et al.* Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, jan. 2007. v. 115, n. 1–2, p. 107–125. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242706002728>>.

SANTOS, Bruna Parapinski *et al.* Blood and milk polymorphonuclear leukocyte and monocyte/macrophage functions in naturally caprine arthritis encephalitis virus infection in dairy goats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, jun. 2017. v. 188, p. 21–26. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242717302040>>.

SANTOS, R. A. *et al.* Aspectos clínicos e características do leite em ovelhas com

mastite induzida experimentalmente com *Staphylococcus aureus*. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, 2007. v. 27, n. 1, p. 6–12.

SCHALM'S. **Veterinary Hematology**. 6 th ed. Ames, Iowa, USA: [s.n.], 2010.

SCHULTHESS, B. *et al.* Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper for Identification of Gram- Positive Rods : Development of a Diagnostic Algorithm for the Clinical. **Journal of Clinical Microbiology**, 2014. v. 52, n. 4, p. 1089–1097.

SCHUTZE, G. E. *et al.* Role of neutrophil receptors in opsonophagocytosis of coagulase-negative staphylococci. **Infection and Immunity**, 1991. v. 59, n. 8, p. 2573–2578.

SEYFFERT, N. *et al.* *Staphylococcus aureus* proteins differentially recognized by the ovine immune response in mastitis or nasal carriage. **Veterinary Microbiology**, 2012. v. 157, p. 439–447.

SMITS, E.; BURVENICH, C.; HEYNEMAN, R. Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, maio. 1997. v. 56, n. 3–4, p. 259–269. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016524279605739X>>.

SOUZA, F. N. *et al.* Somatic cell count in small ruminants: Friend or foe? **Small Ruminant Research**, v. 107, n. 2–3, p. 65–75, out. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0921448812001538>>.

SOUZA, R. M. **Espécies e cepas estafilocócicas associadas a bovinos se comportam de maneira diferente em sua capacidade de resistir à fagocitose e desencadear a atividade de explosão respiratória por leucócitos polimorfonucleares do sangue e do leite em vacas leiteiras**. 2018. Universidade de São Paulo, 2018.

SPAAN, A. N. *et al.* Neutrophils Versus *Staphylococcus aureus* : A Biological Tug of War . **Annual Review of Microbiology**, 2013. v. 67, n. 1, p. 629–650.

SPILIOPOULOU, A. I. *et al.* An extracellular *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide : relation to Polysaccharide Intercellular Adhesin and its implication in phagocytosis An extracellular *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide : relation to Polysaccharide Intercellular Adhesin. **BMC Microbiology**, 2012. v. 12, n. 76.

SUTRA, L.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Phagocytosis of Mastitis Isolates of *Staphylococcus aureus* and Expression of Type 5 Capsular Polysaccharide Are Influenced by Growth in the Presence of Milk. 1990. v. 28, n. 10, p. 2253–2258.

SWAIN, D. K. *et al.* Neutrophil dynamics in the blood and milk of crossbred cows naturally infected with *Staphylococcus aureus*. **Veterinary World**, 2015. v. 8, n. 3, p. 336–345.

THAMMAVONGSA, V. *et al.* Staphylococcal manipulation of host immune responses. **Nature Reviews Microbiology**, 2015. v. 13, n. 9, p. 529–543.

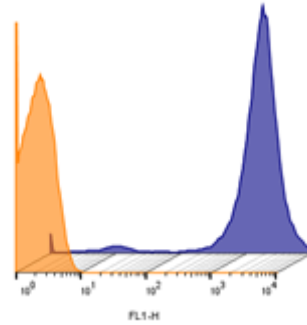
VANDERHAEGHEN, W. *et al.* Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative *Staphylococcus* species associated with ruminant udder health. **Journal of Dairy Science**, 2014. v. 97, n. 9, p. 5275–5293. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7775>>.

#### 4. Considerações Finais

Este é o primeiro trabalho a avaliar a atividade de PMNL do sangue de ovelhas desafiados com diferentes isolados de *Staphylococcus* spp. Os resultados deste estudo demonstraram que a modulação da resposta imune, considerando a função fagocítica dos PMNL a *S. aureus* variou entre as raças estudadas e a heterogeneidade entre as espécies de NAS impactaram a resposta do hospedeiro, fato que pode estar relacionado com a evasão do processo de fagocitose por PMNL, podendo refletir no processo inflamatório e na gravidade da infecção. Sabe-se que a modulação da resposta imune à um desafio infeccioso por patógeno bacteriano depende da co-relação entre os envolvidos (característica do isolado bacteriano e competência imunológica animal). Desta forma, estudos que busquem compreender as características das raças, influências relacionadas a aptidão produtiva, ao manejo, as condições sanitárias do rebanho e as espécies bacterianas envolvidas nos processos infecciosos devem ser bem conhecidas e levadas em consideração para o estabelecimento de alternativas para condutas terapêuticas, medidas profiláticas e de prevenção a infecções.

## Anexos

### Capítulo 1



**Supplemental Figure S1.** Flow cytometry histogram overlay showing the geometric mean fluorescence intensity (FL1-H) of unlabelled (on the left, in orange; geometric mean fluorescence intensity = 1.98) and 5(6)-carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE)-labeled *S. aureus* (on the right, in purple; geometric mean fluorescence intensity = 1,248).

**Supplemental Table S1.** Percentage (mean percentage  $\pm$  standard error) of blood PMNLs viability of primiparous and multiparous Santa Inês and Lacaune ewes

|   | <b>Primiparous<br/>Santa Inês</b> | <b>Multiparous<br/>Santa Inês</b> | <b>Primiparous<br/>Lacaune</b> | <b>Multiparous<br/>Lacaune</b> |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>Annexin V-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup> (%)</b> | 7.84 $\pm$ 1.72 <sup>a</sup>      | 3.41 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>      | 7.11 $\pm$ 1.14 <sup>a</sup>   | 4.26 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup>   |
| <b>Annexin V-FITC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup> (%)</b> | 1.77 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>      | 1.71 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>      | 1.85 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>   | 1.65 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>   |
| <b>Annexin V-FITC<sup>-</sup>/7-AAD<sup>+</sup> (%)</b> | 1.06 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>      | 1.34 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>      | 1.11 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>   | 0.85 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>   |
| <b>Annexin V-FITC<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup> (%)</b> | 89.31 $\pm$ 2.13 <sup>a</sup>     | 93.54 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>     | 89.93 $\pm$ 1.47 <sup>a</sup>  | 93.23 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>  |

Different letters indicated  $P \leq 0.05$ .



**Supplemental Table S2.** Percentage and geometric mean fluorescence (mean  $\pm$  standard error) of blood PMNLs opsonized and unopsonized *S. aureus* phagocytosis by primiparous and multiparous Santa Inês and Lacaune ewes

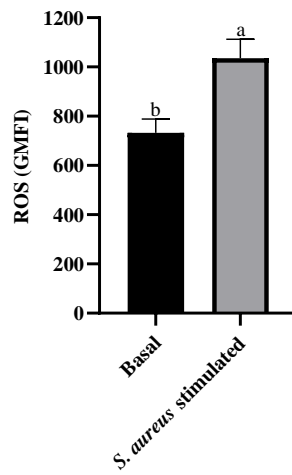
|  | <b>Primiparous<br/>Santa Inês</b> | <b>Multiparous<br/>Santa Inês</b> | <b>Primiparous<br/>Lacaune</b> | <b>Multiparous<br/>Lacaune</b> |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>Unopsonized phagocytosis (%)</b>    | 26.66 $\pm$ 2.38 <sup>b</sup>     | 66.29 $\pm$ 6.47 <sup>a</sup>     | 20.86 $\pm$ 4.43 <sup>b</sup>  | 56.81 $\pm$ 9.64 <sup>a</sup>  |
| <b>Unopsonized phagocytosis (GMFI)</b> | 13.66 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>     | 25.07 $\pm$ 4.33 <sup>a</sup>     | 16.04 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>  | 16.30 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>  |
| <b>Opsonized phagocytosis (%)</b>      | 37.33 $\pm$ 5.84 <sup>a</sup>     | 15.54 $\pm$ 2.85 <sup>b</sup>     | 36.77 $\pm$ 5.85 <sup>a</sup>  | 19.58 $\pm$ 4.78 <sup>b</sup>  |
| <b>Opsonized phagocytosis (GMFI)</b>   | 13.49 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>     | 11.96 $\pm$ 0.15 <sup>c</sup>     | 15.06 $\pm$ 0.47 <sup>a</sup>  | 12.16 $\pm$ 0.25 <sup>c</sup>  |

Different letters indicated  $P \leq 0.05$ .

**Supplemental Table S3.** Percentage and geometric mean fluorescence of intracellular ROS production (mean percentage  $\pm$  standard error) by blood PMNLs under unstimulated (basal) and stimulated *S. aureus* conditions by primiparous and multiparous Santa Inês and Lacaune ewes

|   | <b>Primiparous<br/>Santa Inês</b> | <b>Multiparous<br/>Santa Inês</b> | <b>Primiparous<br/>Lacaune</b> | <b>Multiparous<br/>Lacaune</b> |
|---|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>Basal ROS Production (%)</b>   | 97.36 $\pm$ 2.23 <sup>a</sup>     | 99.61 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>     | 99.56 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>  | 99.71 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  |
| <b>Basal ROS Production (GMFI)</b>  | 923.9 $\pm$ 157.3 <sup>a</sup>    | 640.9 $\pm$ 58.17 <sup>a</sup>    | 730.6 $\pm$ 124.4 <sup>a</sup> | 633.7 $\pm$ 57.58 <sup>a</sup> |
| <b>ROS production under <i>S. aureus</i><br/>stimulation condition (%)</b>    | 99.97 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>     | 99.73 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>     | 99.90 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>  | 97.29 $\pm$ 2.27 <sup>b</sup>  |
| <b>ROS production under <i>S. aureus</i><br/>stimulation condition (GMFI)</b> | 1102 $\pm$ 227.2 <sup>a</sup>     | 966.3 $\pm$ 51.17 <sup>a</sup>    | 963.0 $\pm$ 146.8 <sup>a</sup> | 1108 $\pm$ 169.5 <sup>a</sup>  |

ROS: reactive oxygen species. GMFI: geometric mean fluorescence intensity. Different letters indicated  $P \leq 0.05$ .



**Supplemental Figure S2.** Overall geometric mean fluorescence intensity (GMFI) of intracellular reactive oxygen species (ROS) production by polymorphonuclear leukocytes under unstimulated (basal) and *S. aureus*-stimulated conditions. Different letters indicated  $P \leq 0.05$ .

## Folder para divulgação de informações práticas

### MASTITE

Inflamação da glândula mamária que dificulta a amamentação e o desenvolvimento do borrego.



#### Sinais:

- ❖ Relutância da ovelha a mamada;
- ❖ Borregos inquietos.

É necessário estar atento aos sinais para evitar perder a cria ou a própria matriz.

Ovelhas da raça Santa Inês são reconhecidas por sua ótima habilidade materna e capacidade de criar seus borregos.



#### Pesquisadores:

Michele Flávia S. Marques

Méd. Veterinária | Pós graduanda – UFPB | UFRPE  
Michele\_flavia4@hotmail.com

Guilherme Santana de Moura

Méd. Veterinário – Pós graduando – UFRPE  
guilhermesmoura@hotmail.com

Luciana B. B. C. da Costa

Professora OSU-USA/Consultora  
da-costa.2@osu.edu

Rinaldo Aparecido Mota

Professor | Orientador – UFRPE | PPGBA  
Rinaldo.mota@hotmail.com

#### Apoio:



## Manejo de Ovelhas Santa Inês Pós Parto



#### Para Evitar:

- ❖ Ocorrência de mastite
- ❖ Mortalidade das crias

No **Pós Parto** é importante observar:



Presença de leite na glândula mamária

Mamada eficiente da(s) cria(s)



- Balanço da cauda durante a mamada;
- Satisfação e calma pós mamada.

Durante a **Lactação** é importante observar:

Parto simples (uma cria):



- se a cria mama nos dois tetos
- se não está havendo acúmulo de leite em uma das mamas



A = Normal;

B = Ovelha com mastite na glândula mamária direita, decorrente do acúmulo de leite.

Parto múltiplo (duas ou mais crias):

- se todas as crias mamam e ficam saciadas.

Quando realizar a secagem ?  
Quando houver óbito ou separação do borrego

**Protocolo de secagem :**

1

Realizar ordenha  
1 vez ao dia.



O ordenhador deve seguir as normas de higiene de ordenha



2

Produção de leite menor que 200 mL/dia, a ordenha passa a ser em dias intercalados



3

Com produção menor que 100 mL/dia, ordenhar 1 vez por semana até a completa secagem (produção menor que 30 mL/semana ou perda da característica láctea)