

Perfil Celular do Coloostro de Éguas: Estudo Preliminar

Cellular profile of mares colostrum: a preliminary study

Resumo

Existem poucos trabalhos na literatura relativos aos tipos de leucócitos presentes no coloostro e no leite de éguas. Recentes trabalhos realizados em animais de produção sugerem que os leucócitos do coloostro podem desempenhar um importante papel na transferência passiva de imunidade da mãe para o neonato. Esse estudo teve como objetivo caracterizar a população de leucócitos presente no coloostro de éguas clinicamente saudáveis utilizando a microscopia óptica. As amostras de coloostro utilizadas foram provenientes de 20 éguas, 12 da raça Mangalarga Marchador e 8 da raça Quarto de Milha. O tipo celular predominante na maioria das amostras estudadas foi o macrófago, seguida pelos neutrófilos e linfócitos. Esses resultados podem proporcionar um ponto de partida para futuros estudos de investigação sobre o papel dos leucócitos colostrais na transferência de imunidade da égua para o potro.

Summary

There are few reports on which leukocytes are present in the colostrum and milk of mares. Recent studies in farm animals suggest a role for colostrum leukocytes in the transfer of passive immunity from dam to neonate. The aim of this study was to characterize the population of leukocytes present in colostrum from clinically healthy mares, using the light microscopy. Colostrum samples were collected from 20 mares, 12 Mangalarga Marchador and 8 Quarter Horse. Macrophages were the predominant cell type in most samples studied followed by neutrophils and lymphocytes. These results may be a starting point for future studies investigating the role of colostrum leukocytes in the transfer of immunity from mare to foal.

Bruna Busianov Zaharov Simon¹
Neimar Vanderlei Roncati²
Alma Yasodhara Alexandra Hoge³
Ana Carolina Rusca Correa Porto³

Rua Dr. Almeida Lima, n.1134, Mooca, cep: 03164-000, São Paulo/SP
☎ +55 11 973299466
✉ brunabusianov@hotmail.com



Palavras-chave

Colostro. Potros. Transferência de imunidade passiva. Leucócitos.

Keywords

Tuberculosis. Zoonoses. Human health.
Mycobacterium bovis.

Os neonatos equinos nascem agamaglobulinêmicos, sendo dependentes da ingestão de imunoglobulinas colostrais e falhas na transferência passiva destes anticorpos podem levar a infecções neonatais. Os potros iniciam o desenvolvimento das funções imunes no período intrauterino, porém de maneira pouco satisfatória. O desenvolvimento da resposta imune só é realmente estimulado após o nascimento, quando os potros entram em contato com os microorganismos do ambiente (FLAMINIO et al., 2000; BOYD et al., 2003; HOLZNAGEL et al., 2003; TALLMADGE et al., 2009). Até que os animais respondam de uma maneira eficaz aos desafios ambientais, eles permanecem em um período crítico com maior suscetibilidade as infecções neonatais (GARDNER et al., 2007).

Mesmo quando não há falhas na transferência de imunoglobulinas via colostro, os equinos neonatos permanecem suscetíveis a uma variedade de patógenos que raramente afetam equinos adultos, como *Rhodococcus equi*, *Pneumocystis carini*, *Candida albicans* e rotavírus (BOYD et al., 2003; HOROHOV et al., 2006). Muito se fala sobre a importância dos anticorpos do colostro para a proteção do neonato, mas pouco se sabe sobre o papel dos leucócitos contidos no colostro na proteção contra infecções. Estudos realizados com animais de produção demonstram a existência de um número significativo

1 Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, SP – Brasil

2 Professor Doutor do Curso de Medicina Veterinária, Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo, SP – Brasil.

3 Pesquisadora do Instituto de Fomento Veterinário, Cotia, SP – Brasil.

de leucócitos no colostro e sabe-se que em ovinos, suínos e bovinos esses leucócitos são funcionais e podem aumentar a expressão de marcadores de superfície, indicando ativação (TURNER et al., 2003). Foi demonstrado que, após a ingestão, estas células presentes no colostro possuem a capacidade de cruzar a barreira da mucosa intestinal do neonato e de se instalarem em linfonodos mesentéricos, sangue, pulmões, fígado e baço, onde contribuem para as defesas imunitárias do neonato (LE JAN, 1996). Não foram encontrados na literatura relatos sobre o perfil celular do colostro de éguas sadias, havendo apenas descrições em éguas com mastite (FREEMAN, 1993).

O papel das células contidas no colostro humano foi estabelecido na década de 70 quando foi demonstrado que além da importância das células fagocíticas (HO; LAWTON, 1978; ROBINSON; HARVEY; SOOTHILL, 1978), os linfócitos contidos nessas secreções possuem a capacidade de proliferação *in vitro* frente a diversos mitógenos e antígenos (PARMELEY; BEER; BILLINGHSM, 1976; OGRA; OGRA, 1978). Hoje se sabe que os componentes imunes do colostro e do leite são importantes para todos os jovens mamíferos (WHEELER et al., 2007; STELWAGEN et al., 2009), porém raros trabalhos foram desenvolvidos com a espécie equina.

As citocinas estão presentes no colostro equino e podem desempenhar papéis fundamentais no desenvolvimento imune precoce dos potros (SECOR; MATYCHAK; FELIPPE, 2012). Tais observações ressaltam a necessidade de se investigar os componentes celulares do colostro equino e determinar qual a sua função. Diante disso, o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil celular do colostro de éguas clinicamente sadias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizadas doze éguas prenhes da raça Mangalarga Marchador e oito éguas prenhes da raça Quarto de Milha, com cinco e dezesseis anos de idade e mantidas em piquetes de capim *coast cross* durante todo o período gestacional. Além do capim, os animais receberam ração comercial duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Foram realizadas vacinações contra rinopneumonite equina (Herpes Horse, Laboratórios Vencofarma do Brasil, Londrina, PR, BR) nos quinto e sétimo mês de gestação e contra rinopneumonite, tétano, encefalomielite e influenza equina (Lexington, Laboratórios Vencofarma do Brasil, Londrina, PR, BR) no nono mês de gestação. Nenhum dos animais apresentava manifestações clínicas de mastite.

Colheita de colostro e preparação das amostras

Foi colhida uma amostra de 100 mL de colostro, em até seis horas após o nascimento do potro. As amostras foram diluídas com o mesmo volume de *phosphate buffered saline* (PBS) e centrifugadas a 1000 x g por 15 minutos a 4 °C, Koess e Hamann (2008). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado pela inversão única do frasco. O botão celular, conservado na superfície inferior do frasco foi removido por meio de aspersão gentil com 30 mL de PBS. Uma nova centrifugação foi realizada a 400 x g por 10 minutos a 4° C. Após desprezar o sobrenadante as células foram ressuspendidas em 1mL de meio de cultivo celular (RPMI 1640, Cultilab, Campinas, SP, BR) enriquecido com soro fetal bovino 10% (SFB, Cultilab, Campinas, SP, BR) (KOESS; HAMANN, 2008).

Avaliação do perfil celular do colostro

Para avaliação das porcentagens celulares, amostras de 100mL de suspensões celulares foram centrifugadas a 28 x g durante seis minutos, em citocentrífuga. As lâminas foram fixadas com álcool metílico e coradas com corante Panotico (Panotico Rápido, LaborClin, Pinhais, PR, BR). A leitura das lâminas foi realizada por microscopia óptica de imersão em aumento de 1000x. Para a contagem diferencial foram analisadas 100 células.

Resultados e discussão

Pode-se observar uma grande variação no perfil celular das amostras de colostro estudadas. A célula predominante na maioria das amostras foi o macrófago (9/20), seguido pelo neutrófilo (7/20) e linfócito (4/20) (Tabela 1). Raros eosinófilos foram observados.

Pode-se notar que os macrófagos na sua maioria possuíam vacúolos contendo gotas de lipídios ou debris celulares, assim como observado com o colostro de outras espécies (LEE; MCCAULEY; HARTMAN, 1983) (Figura 1).

Em seis das sete amostras que apresentaram uma maior concentração de neutrófilos foram observados a presença de bactérias e alto grau de degeneração dos neutrófilos (Figura 2). Lee, Peter Wooding e Kemp (1980) e Evans et al. (1982), em amostras de bovinos e suínos, constataram que o neutrófilo foi o tipo celular predominante no colostro, mesmo quando não foi detectada infecção. Resultado semelhante foi observado por Lee e Outteridge (1981) onde foi demonstrada a predominância no colostro de ovelhas de polifomorfonucleares (41-84%) seguidos por macrófagos (8-49%) e linfócitos (6-11%). Os neutrófilos, assim como os macrófagos são responsáveis por fagocitar não apenas os microorganismos como também debris celulares e

Animal	Tipo celular			
	Macrófagos	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos
1	21	33	43	3
2	33	11	56	-
3	61	18	21	-
4	100	0	0	-
5	29	41	29	-
6	48	26	16	-
7	42	34	22	-
8	26	49	23	2
9	27	69	7	-
10	24	34	42	-
11	8	59	21	-
12	23	47	26	1
13	97	14	17	-
14	77	10	13	-
15	63	29	8	-
16	70	13	17	-
17	2	98	3	-
18	52	27	21	-
19	18	39	42	-
20	18	64	22	-

TABELA 1 – Contagem diferencial de células do colostro de éguas clinicamente sadias

gotículas de gordura, porém de uma maneira menos eficiente. O neutrófilo também foi o tipo celular predominante encontrado no colostro e leite de fêmeas cobaias (NORDIN; LEE, 1982).

Na espécie equina (TURNER et al., 2003) demonstrou por meio de citometria de fluxo, porcentagens médias de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e células epiteliais de 13,2%; 22,4%; 63,2% e 1,3% respectivamente após a utilização de imunostimulantes. Tal resultado difere do encontrado no presente trabalho, contudo os grupos não são comparáveis, já que as éguas aqui estudadas não foram submetidas a nenhuma estimulação e as técnicas empregadas foram diferentes.

Poucas células epiteliais foram observadas (0-1%) concordando com a descrição efetuada em ovelhas (LEE; OUTERIDGE, 1981), porcas (EVANS et al., 1982) e cobaias (NORDIN; LEE, 1982).

A despeito do pouco conhecimento sobre o perfil celular do colostro equino, bem como das suas funções, foi demonstrado que assim como em outras espécies, o colostro equino contém componentes imunes além das imunoglobulinas (DAVIS, 2012). Secor, Matychak e Felipe (2012) determinaram os níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no colostro equino e

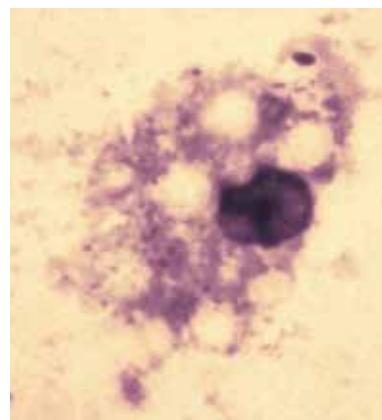


FIGURA 1 – Fotomicrografia de macrófago do colostro equino, contendo gotas de lipídeos, identificado morfológicamente por microscopia óptica de imersão (1000x)

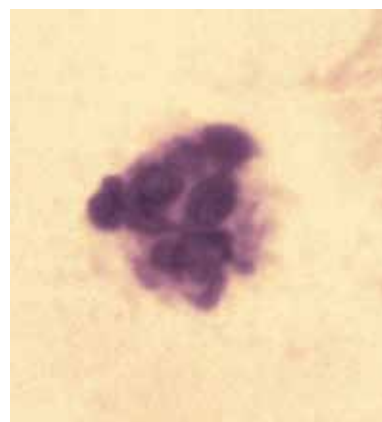


FIGURA 2 – Fotomicrografia de neutrófilo degenerado do colostro equino identificado morfológicamente por microscopia óptica de imersão (1000x)

investigaram a correlação desse fator no colostro e no soro dos potros. O TNF- α é um produto dos leucócitos e constitui um componente imune essencial pelos seus efeitos diretos ou regulatórios sobre a ação de citocinas em diversas células do hospedeiro levando morte de patógenos. Foram obtidas evidências de que o TNF- α transferido pelo colostro pode desempenhar um importante papel na manutenção da saúde dos potros (SECOR; MATYCHAK; FELIPPE, 2012). O estudo dos componentes imunes do colostro equino associado à distribuição e dinâmica celular pode prover informações que poderão contribuir na tentativa de aumentar a sobrevivência de potros comprometidos.

Conclusão

A célula predominante na maioria das amostras estudadas foi o macrófago. Novos estudos devem ser realizados para a avaliação das variações do perfil celular no colostro e no leite de éguas, considerando-se o tempo, e correlacionando-se o possível papel dessas células na resposta imune dos potros neonatos.

Referências

1. BOYD, N. K.; COHEN, N. D.; LIM, W. S.; MARTENS, R. J.; CHAFFIN, M. K.; BALL, J. M. Temporal changes in cytokine expression of foals during the first month of life. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 92, p. 75-85, 2003.
2. DAVIS, E. Maintaining health in foals: the role of colostrum constituents. **Veterinary Records**, v. 170, n. 2, p. 49-50, 2012.
- a. EVANS P. A.; NEWBY, T. J.; STOKES, C. R.; BOURNE, F. J. A study of cells in the mammary secretions of sows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 3, n. 5, p. 515-527, 1982.
3. FLAMINIO, M. J.; RUSH, B. R.; DAVIS, E. G.; HENNESSY, K.; SHUMAN, W.; WILKERSON, M. J. Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 3-4, p. 267-285, 2000.
4. FREEMAN, K. P. Cytological evaluation of the equine mammary gland. **Equine Veterinary Education**, v. 5 p. 212, 1993.
5. GARDNER, R. B.; NYDAM, D. V.; LUNA, J. A.; BICALHO, M. L.; MATYCHAK, M. B.; FLAMINIO, M. J. Serum opsonization capacity, phagocytosis, and oxidative burst activity in neonatal foals in the intensive care unit. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 4, p. 797-805, 2007.
6. HO, P. C.; LAWTON, J. W. M. Human colostrum cells: Phagocytosis and killing of *E. coli* and *C. albicans*. **Journal Pediatric**, v. 93, p. 910-915, 1978.
7. HOLZNAGEL, D. L.; HUSSEY, S.; MIHALYI, J. E.; WILSON, W. D.; LUNN, D. P. Onset of immunoglobulin production in foals. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 6 p. 620-622, 2003
8. HOROHOV, D. W.; STURGILL-WRIGHT, T.; STILTNER J. L.; ADAMS, A. A.; LUNN, D. P.; HOROHOV, D. W. Foals are interferon gamma-deficient at birth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3-4, p. 119-209, 2006.
9. KOESS, C.; HAMANN, J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 2, p. 225-232, 2008.
10. LEE C. S.; MCCAULEY, I.; HARTMAN, P. E. Light and Electron Microscopy of cells in pig colostrum, milk and Involution Secretion. **Acta Anatomica**, v. 117, n. 3, p. 270-280, 1983.
11. LEE, C. S.; OUTERIDGE, P. M. Leucocytes of sheep colostrum, milk and involution secretion, with particular reference to ultrastructure and lymphocyte sub-populations. **Journal of Dairy Research**, v. 48, n. 2, p. 225-237, 1981.
12. LEE C. S.; PETER WOODING, F. B. P.; KEMP, P. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. **Journal of Dairy Research**, v. 47, n. 1, p. 39-50, 1980.
13. LE JAN, C. Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity: A review. **Veterinary Research**, v. 27, n. 4-5, p. 403-417, 1996.
14. NORDIN, W.; LEE, C. S. Cytology of Milk in Guinea Pigs. **Acta Anatomica**, v. 113, p. 135-144, 1982.
15. OGRA, S. S.; OGRA, P. L. Immunologic aspects of human colostrum and milk. II. Characteristics of lymphocytic reactivity and distribution of E. rosette primary cells at different times after the onset of lactation. **Journal Pediatric**, v. 92, p. 550-555, 1978.
16. PARMELEY, M. J.; BEER, A. A. E.; BILLINGHSM; R. E. In vitro studies on T lymphocyte population of human milk. **The Journal Experimental Medicine**, v. 144, p. 358-370, 1976.
17. ROBINSON, J. E.; HARVEY, B. A. M.; SOOTHILL; J. F. Phagocytosis and killing of bacteria and yeast by human milk cells after opsonisation in aqueous phase of milk. **British Medical Journal**, v. 1, p. 1443-1445, 1978.
18. SECOR, E. J.; MATYCHAK, M. B.; FELIPPE, M. J. B. Transfer of tumour necrosis factor - α via colostrum to foals. **Veterinary Record**, v. 170, n. 2, p. 51, 2012.
19. STELWAGEN, K.; CARPENTER, E.; HAIGH, B.; HODGKINSON, A.; WHEELER, T. T. Immune components of bovine colostrum and milk. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 3-9, 2009.
20. TALLMADGE, R. L.; MCLAUGHLIN, K.; SECOR, E.; RUANO, D.; MATYCHAK, M. B.; FLAMINIO, M. J. Expression of essential B cell genes and immunoglobulin isotypes suggests active development and gene recombination during equine gestation. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 1027-1038, 2009.
21. TURNER, J. L.; PAS, M. J.; PAS, A. R. N. S.; MINTON, J. E. Effects of Non-Specific Immunostimulation of Prepartum Mares on Colostral Quality and Foal Immune Function. **The Professional Animal Scientist**, v. 19, p. 62-67, 2003.
22. WHEELER, T. T.; HODGKINSON, A. J.; PROSSER, C. G.; DAVIS, S. R. Immune components of colostrum and milk-A historical perspective. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 12, n. 4, p. 237-247, 2007.