

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LUCIANE TAVARES DA CUNHA

Estudo da interação da alga *Prototheca zopfii* com neutrófilos recuperados de leite bovino e ação do sistema AIA/HRP sobre este patógeno

LUCIANE TAVARES DA CUNHA

Estudo da interação da alga *Prototheca zopfii* com neutrófilos recuperados de leite bovino e ação do sistema AIA/HRP sobre este patógeno

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo

*"Nenhuma atividade no bem é insignificante...
As mais altas árvores são oriundas de
minúsculas sementes.
Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
não fosse por elas, eu não teria saído do lugar."
(Chico Xavier)*

Dedicatória

À Deus por este momento importante da minha vida e por esta
grande conquista...

Aos meus pais, Suely e Paulo (*in memoriam*), por serem a base de
tudo...

Aos meus irmãos, Elisane e Ricardo, companheiros e amigos para
sempre...

Agradecimentos

Primeiramente à toda minha família que se constitui no grande sentido da minha luta e no meu exemplo.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP pela oportunidade de estudar em uma instituição de ensino de excelência.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado pois sem este auxílio este trabalho não seria possível.

À FAPESP pelo apoio financeiro para aquisição de material e execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Mariza Pires de Melo, em especial pela amizade, orientação, competência, confiança depositada em mim e no trabalho realizado e pelos tantos ensinamentos nas questões profissionais e pessoais, muito importantes, pois ficam guardados para o resto da vida.

À Especialista em Laboratório Silvana Marina Piccoli Pugine pela grande amizade, apoio, competência, profissionalismo, pelas experiências passadas e compartilhadas, pela paciência e convivência diária, pelo carinho e cuidado por todos estes anos.

À Especialista em Laboratório Márcia Ramos Monteiro da Silva pela amizade, incentivo, profissionalismo, pela paciência em me ensinar assuntos de biologia molecular, e pelo convívio dentro e também fora do ambiente de trabalho no que resultou em muitos momentos especiais.

À Especialista em Laboratório Giovana Krempel F. Merighe pela amizade e pelo apoio nos experimentos realizados em biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Ernane J. X. da Costa pela amizade, apoio ao projeto e tratamento de dados através de softwares disponíveis em seu laboratório.

Ao Prof. Antônio A. M. Maia pela amizade e apoio por disponibilizar as técnicas, equipamentos e material para PCR.

Ao Laboratório de MMD por disponibilizar o microscópio de fluorescência.

Ao Prof. Dr. Rodrigo R. Petrus e à Profa. Dra. Eliana S. Kamimura pela oportunidade em realizar o Estágio Supervisionado em Docência no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

À Profa. Dra. Andrea Rentz Ribeiro da PUC, Poços de Caldas/MG, pela doação dos isolados do microrganismo.

À Conceição, Layla e Alecsandra pela paciência e atenção.

Aos amigos do Laboratório de Química Biológica Andréia, Eli, Roberto, Pamela, Rosana, Patrícia, Alessandra pela amizade, convivência e incentivo aos trabalhos.

Aos funcionários da FZEA/USP, Robertinha, Aldo, Nilton, Sandra, Mirele, Andréa, Flávia, Marcelo, Ricardo, Rosângela, Rafael, Antonio (China), Keila, Roice pelas contribuições e pela oportunidade de nos tornarmos amigos.

À todos os estagiários que passaram pelo Laboratório de Química Biológica pela ajuda nos trabalhos.

Aos amigos Sissa, Gonçalo, Andréa Luciana, Profa. Dra. Eliana C. S. Rigo, Profa. Dra. Elyara M. P. Silva pela força e amizade todo este tempo.

À todos aqueles que me ajudaram direta ou indiretamente.

Meus sinceros agradecimentos...

RESUMO

CUNHA, L.T. **Estudo da interação da alga *Prototheca zopfii* com neutrófilos recuperados de leite bovino e ação do sistema AIA/HRP sobre este patógeno.** 2010. 100 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

Estudos têm mostrado a incidência de mastite bovina associada à alga *Prototheca zopfii*. O objetivo deste trabalho foi estudar a interação da *P. zopfii* com neutrófilos recuperados de leite bovino e avaliar o efeito do sistema ácido indol-3-acético/peroxidase de raiz forte (AIA/HRP) sobre a viabilidade deste microrganismo em experimentos *in vitro*. A *P. zopfii* foi recuperada de vacas com mastite clínica e, no laboratório, foram realizadas a caracterização molecular, morfológica e crescimento exponencial do microrganismo. Em seguida, neutrófilos recuperados de leite bovino foram incubados na ausência e na presença de *P. zopfii* opsonizada e foram avaliadas a produção de peróxido de hidrogênio, enzimas antioxidantes dos neutrófilos e microrganismo, e a capacidade fagocitária. Em outro estudo, a *P. zopfii* foi incubada com o sistema AIA/HRP e foram avaliadas a viabilidade por unidades formadoras de colônias (UFC), atividade de enzimas antioxidantes, integridade de membrana por exclusão com azul de Trypan e integridade do DNA. Os resultados foram analisados pela análise de variância com significância de 5% usando o teste Tukey. Foram observados diversos tamanhos celulares da *P. zopfii*, presença de autofluorescência, crescimento exponencial ao longo do tempo de incubação em que não foi possível determinar o início da fase de morte. Ainda, foram encontrados os genótipos 1, 2 e 3 nos isolados em estudo. A produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos na presença da alga foi estimulada 5 vezes em relação ao controle, estimulou a atividade das enzimas catalase (CAT) em 21% e glutaciona redutase (GR) em 27% e não houve diferença significativa quanto à atividade de CAT, GR e superóxido dismutase (SOD) produzido pela *P. zopfii*. Também foi verificado que a *P. zopfii* não foi englobada pelo neutrófilo. O sistema AIA/HRP inibiu o crescimento do microrganismo em 45, 82 e 88% nos tempos de 4, 6 e 9 horas de incubação; a atividade da SOD, CAT, Glutaciona Peroxidase (GPx) e GR aumentou respectivamente em 90, 120, 150% e 3,4 vezes; houve redução da viabilidade da *P. zopfii* em 10, 15, 20, 25 e 32% após os tempos de 4, 6, 8, 10 e 12 horas de incubação; e não afetou a integridade do DNA após 6 horas de incubação. Conclui-se que a *P. zopfii* é altamente resistente frente aos neutrófilos e demonstrou ser susceptível quanto ao efeito microbicida do sistema AIA/HRP.

Palavras-chave: ácido indol-3-acético; peroxidase de raiz forte; mastite; microbicida; *P. zopfii*.

ABSTRACT

CUNHA, L.T. **Study of the interaction of the algae *Prototheca zopfii* with neutrophils recovered from bovine milk and action of the IAA/HRP on this pathogen.** 2010. 100 f. Ph.D. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

Studies have shown the incidence of bovine mastitis associated with the algae *Prototheca zopfii*. The objective of this work was to study the interaction of *P. zopfii* with neutrophils recovered from bovine milk and to evaluate the effect of system indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase (IAA/HRP) on the viability of this microorganism *in vitro* experiment. *P. zopfii* was recovered from cows with clinical mastitis and both the molecular and morphological characterization were performed besides the evaluation of exponential growth of the microorganism in the laboratory. Next, neutrophils recovered from bovine milk were incubated in the absence and presence of opsonized *P. zopfii* and were evaluated the production of hydrogen peroxide, antioxidant enzymes on neutrophils and microorganism, and phagocytic capacity. In another study, *P. zopfii* was incubated with the system IAA/HRP and the viability assessed by colony forming units (CFU), antioxidant enzymes activity, membrane integrity by exclusion with Trypan blue and DNA integrity. The results were analyzed by analysis of variance with a 5% significance using the Tukey test. Results from *P. zopfii* characterization showed various cellular sizes, presence of autofluorescence, exponential microorganism growth throughout the incubation time and was not possible to determine the beginning of the death. Moreover it was found genotypes 1, 2 and 3 in the isolates in study. The production of hydrogen peroxide by neutrophils in the presence of algae was stimulated 5 times compared to the control, increase the activity of catalase (CAT) in 21% and glutathione reductase (GR) in 27% was seen in neutrophils; and there was no significant difference in CAT, GR and superoxide dismutase (SOD) activity produced by *P. zopfii*. *P. zopfii* was not engulfment by neutrophils. The system IAA/HRP inhibited the growth of the microorganism in 45, 82 and 88% in the times of 4, 6 and 9 hours of incubation, the activity of SOD, CAT, glutathione peroxidase (GPx) and GR increased respectively by 90, 120, 150%, and 3.4 times, decreased the viability of *P. zopfii* 10, 15, 20, 25 and 32% after the times of 4, 6, 8, 10 and 12 hours of incubation, and did not affect the integrity of DNA after 6 hours of incubation. As a conclusion, *P. zopfii* is highly resistant to the neutrophils and demonstrated to be susceptible to the effect microbicidal of system IAA/HRP.

Keywords: indole-3-acetic acid; horseradish peroxidase; mastitis; microbicide; *P. zopfii*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema ilustrativo (FRANDSON, 1986; WHITTEMORE, 1980) dos principais componentes da glândula mamária de uma vaca em lactação (A) e dos alvéolos secretores de leite (B). Legenda: (1) Canal do teto (2) Cisterna do teto, (3) Cisterna da glândula, (4) Tecido glandular, (5) Veia abdominal subcutânea, (6) Artéria, veia e vasos mamários, (7) Vasos capilares para suprimento de sangue, (8) Camada de células mioepiteliais, (9) Células epiteliais secretoras de leite e (10) Lúmen do alvéolo.21
- Figura 2 - Neutrófilo de leite bovino aderido ao microrganismo patogênico, utilizando a coloração Panótica (1000x), ilustrada por VALLE (2005)24
- Figura 3 - Esquema demonstrando a eliminação de hidroperóxidos através das enzimas Glutathione peroxidase (GPx) e Glutathione redutase (GR) agindo sobre o substrato glutathione.....33
- Figura 4 - Biossíntese do ácido indol-3-acético a partir do aminoácido triptofano. Adaptado de Marchioro (2005)36
- Figura 5 - Ciclo catalítico da HRP dependente de peróxido de hidrogênio mostrando suas diferentes formas e a geração de espécies reativas. Adaptado de Berglund et al. (2002)38
- Figura 6 - Reações de oxidação da mieloperoxidase pelo ânion superóxido e outros substratos (KETTLE et al., 2007).....39
- Figura 7 - Formação de radicais reativos da oxidação do AIA pela HRP. Adaptado de Tafazoli e O'brien (2004)40
- Figura 8 - Redução do radical peroxil a MOI, produto final da oxidação com propriedade citotóxica. Formação de radicais reativos da oxidação do AIA pela HRP. Adaptado de Tafazoli e O'brien (2004)41
- Figura 9 - Colheita de leite.....47
- Figura 10 - Transporte das amostras de leite em caixas de isopor com gelo47
- Figura 11 - *California Mastitis Test*: teste subjetivo de campo para diagnóstico de mastite48
- Figura 12 – Viabilidade de neutrófilos através da contagem em câmara de Neubauer no microscópio óptico (400x). Células azuis coradas pelo azul de Trypan foram consideradas mortas (VALLE, 2005)49
- Figura 13 - Esfregaço preparado a fresco corado com azul de metileno (BRITO; VEIGA, 1997), mostrando os diversos tamanhos celulares de *P. zopffii* e células se dividindo internamente com formação de endósporos (1000x).....60
- Figura 14 - Visualização da *P. zopffii* em microscópio de fluorescência: (A) Sem uso dos filtros de excitação e de barragem, (B) Com uso dos filtros, excitação a 450 nm e emissão 515 nm, (C) Com uso dos filtros, excitação a 546 nm e emissão 590 nm, e (D) Com uso dos filtros, excitação a 365 nm e emissão 420 nm (Zeiss, Axioplan 2, Alemanha, 400x).....62
- Figura 15 - Observação macroscópica de colônias de *P. zopffii* crescidas por esgotamento em ágar *Sabouraud* dextrose (A) e visualização das colônias de *P. zopffii* em contador de colônias (B).....63
- Figura 16 - Curva de crescimento exponencial (Log_{10} células/mL) da *P. zopffii* cultivada em meio ágar *Sabouraud* dextrose e em PBS avaliada em função do tempo.64

- Figura 17 - Visualização dos genótipos 1, 2 e 3 da *P. zopfii*. (a) Padrão DNA 100 – 2.000 pares de base (pb); (b) Primer Interno com 450 pb (controle), (c) Genótipo 1 com 150 pb, (d) Genótipo 2 com 165 pb e (e) Genótipo 3 com 125 pb65
- Figura 18 - Avaliação da viabilidade de neutrófilos no microscópio óptico em câmara de Neubauer, utilizando azul de Trypan como corante: as células azuis foram consideradas mortas, (400x)66
- Figura 19 - Efeito da *P. zopfii* na produção de peróxido de hidrogênio (μM por 10^7 células) e atividade de catalase (CAT, $\mu\text{mol}/\text{min}$ por 1,0 mg de proteína) e glutathiona redutase (GR, nmol/min por 0,1 mg de proteína) de neutrófilos de leite bovino. Os valores são apresentados como média e desvio padrão de seis determinações de três experimentos. *Diferença significativa em relação ao respectivo controle (neutrófilo, $P \leq 0,05$).....67
- Figura 20 - Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT, $\mu\text{mol}/\text{min}$ por 1 mg de proteína), glutathiona redutase (GR, nmol/min por 1 mg de proteína) e superóxido dismutase (SOD, $\mu\text{mol}/\text{min}$ por 1 mg de proteína) da *P. zopfii* desafiada com o neutrófilo.....69
- Figura 21 - Imagem obtida por microscopia de fluorescência (excitação em 473 nm, emissão em 580 nm e coloração com laranja de acridina; 1000x). Neutrófilo de leite bovino após incubação com *P. zopfii*: (A) imagem fluorescente contendo neutrófilos viáveis (núcleo lobulado corado de verde) e *P. zopfii* viva (verde) (as setas indicam os microrganismos), (B e C) Imagens processadas pelo Matlab® mostrando a interação entre neutrófilo e *P. zopfii* (a seta indica o ponto de adesão do neutrófilo e o microrganismo). Várias imagens foram obtidas de 50 neutrófilos por cada lâmina e a imagem apresentada foi uma ilustração de três experimentos71
- Figura 22 - Unidades formadoras de colônias (\log_{10} UFC/mL) de *P. zopfii* cultivada em ágar *Sabouraud* dextrose durante 48 horas após incubação em PBS (0, 3, 4, 6 e 9 horas) na ausência (Controle) e presença de AIA, HRP ou sistema AIA/HRP. Os resultados foram expressos com média \pm desvio-padrão ($n = 9$).....73
- Figura 23 - Crescimento da *P. zopfii* incubada por 0, 3, 4, 6 e 9 horas em PBS na ausência (controle) e presença de AIA, HRP e AIA/HRP, avaliado após 48 horas de cultivo em ágar *Sabouraud* dextrose74
- Figura 24 - Atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) em *P. zopfii* após incubação durante 6 horas do microrganismo em PBS na ausência (controle) e presença de AIA, HRP ou sistema AIA/HRP. Os valores foram apresentados como média e desvio-padrão para 6 experimentos ($n=6$). Atividade de SOD, CAT e GPx foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}$ por miligrama de proteína. Atividade de GR foi expresso em nmol/min por miligrama de proteína $\times 10$. *Diferença significativa em relação ao respectivo controle (neutrófilo, $P \leq 0,05$).....75
- Figura 25 - Imagem da *P. zopfii* observada em microscópio óptico utilizando o corante azul de Trypan (400x).....76
- Figura 26 - Viabilidade celular da *P. zopfii* incubada na ausência (controle) e presença de AIA, HRP ou sistema AIA/HRP durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 horas. Os resultados foram expressos com média e desvio-padrão ($n=9$)77
- Figura 27 - Ação do sistema AIA/HRP na integridade do DNA da *P. zopfii* após 6 horas de incubação em PBS: (1) Padrão DNA de 50 a 10.000 pares de base (pb); (2) *P. zopfii* sem incubação (tempo zero); (3) *P. zopfii* na presença de AIA sem incubação (tempo zero); (4) *P. zopfii* na presença de HRP sem incubação (tempo zero); (5) *P. zopfii* na presença do sistema AIA/HRP sem incubação

(tempo zero); (6) *P. zopfii* após incubação; (7) *P. zopfii* na presença de AIA após incubação; (8) *P. zopfii* na presença de HRP após incubação; (9) *P. zopfii* na presença do sistema AIA/HRP após incubação. Os resultados são ilustrativos de três repetições (n=3) em que todas apresentaram as mesmas características..79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados no estudo.....	46
Tabela 2 – Unidades formadoras de colônias (UFC x 10 ² /mL) da <i>P. zopfii</i> contadas antes e após incubação com neutrófilo de leite bovino	72

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Produção leiteira nacional	16
2.2 Glândula mamária	16
2.2.1 Secreção do leite	16
2.2.2 Células somáticas.....	18
2.2.3 Neutrófilos.....	19
2.3 Mastite	20
2.3.1 Mastite bovina associada à <i>P. zopfii</i>	22
2.3.2 Características gerais da <i>P. zopfii</i>	24
2.3.3 Caracterização molecular da <i>P. zopfii</i>	25
2.4 Estresse oxidativo e defesa antioxidante	26
2.5 Sensibilidade da <i>P. zopfii</i> aos antimicrobianos.....	29
2.6 Ácido indol-3-acético (AIA) e peroxidase de raiz forte (HRP).....	31
2.6.1 AIA	31
2.6.2 Peroxidases	33
2.6.3 Sistema AIA/HRP	35
3 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 Reagentes e meio de cultura.....	39
4.2 Obtenção do microrganismo.....	39
4.3 Cultivo da <i>P. zopfii</i>	39
4.4 Caracterização da <i>P. zopfii</i>	40
4.4.1 Morfologia celular	40
4.4.2 Morfologia das colônias	40
4.4.3 Curva de crescimento exponencial em ágar <i>Sabouraud</i> dextrose e PBS	40

4.4.4 Caracterização molecular	41
4.4.4.1 Extração do DNA	41
4.4.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) específica para genotipagem da <i>P. zopfii</i>	41
4.5 Interação da <i>P. zopfii</i> e neutrófilos recuperados de leite bovino	42
4.5.1 Animais	42
4.5.2 Obtenção dos neutrófilos.....	43
4.5.3 Opsonização da <i>P. zopfii</i>	45
4.5.4 Ensaio de fagocitose	45
4.5.5 Produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos.....	46
4.5.6 Atividade específica de enzimas antioxidantes produzidas pelos neutrófilos.....	46
4.5.6.1 Extração das enzimas.....	46
4.5.6.2 Atividade específica da catalase (CAT)	47
4.5.6.3 Atividade específica da glutatona redutase (GR).....	47
4.5.6.4 Determinação de proteínas totais	47
4.5.7 Atividade específica das enzimas antioxidantes produzidas pela <i>P. zopfii</i>	47
4.5.7.1 Extração das enzimas.....	48
4.5.7.2 Atividade específica da catalase (CAT)	48
4.5.7.3 Atividade específica da glutatona redutase (GR).....	48
4.5.7.4 Atividade específica da superóxido dismutase (SOD).....	48
4.5.7.5 Determinação de proteínas totais	49
4.5.8 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias da <i>P. zopfii</i> após incubação com neutrófilos	50
4.5.9 Capacidade fagocitária	50
4.5.10 Processamento de imagem	51
4.6 Viabilidade da <i>P. zopfii</i> frente ao sistema AIA/HRP	51
4.6.1 Obtenção e cultivo da <i>P. zopfii</i>	51
4.6.2 Preparo do AIA e HRP.....	51
4.6.3 Incubação da <i>P. zopfii</i> com o sistema AIA/HRP	51
4.6.4 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).....	52
4.6.5 Atividade específica de enzimas antioxidantes da <i>P. zopfii</i>	52
4.6.5.1 Preparo das amostras.....	52
4.6.5.2 Extração das enzimas.....	52
4.6.5.3 Atividade específica da catalase (CAT)	53
4.6.5.4 Atividade específica da glutatona redutase (GR).....	53
4.6.5.5 Atividade específica da superóxido dismutase (SOD).....	53
4.6.5.6 Atividade específica da glutatona peroxidase (GPx)	53

4.6.5.7 Determinação de proteínas totais	53
4.6.6 Integridade de membrana da <i>P. zopfii</i> por exclusão em azul de Trypan	54
4.6.7 Integridade do DNA da <i>P. zopfii</i>	54
4.6.7.1 Preparo das amostras.....	54
4.6.7.2 Extração de DNA	54
4.6.7.3 Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida.....	54
4.7 Expressão dos resultados e análises estatísticas	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Caracterização da <i>P. zopfii</i>	56
5.1.1 Morfologia celular	56
5.1.2 Morfologia das colônias	58
5.1.3 Curva de crescimento exponencial em ágar <i>Sabouraud</i> dextrose e PBS	59
5.1.4 Caracterização molecular da <i>P. zopfii</i>	60
5.2 Interação da <i>P. zopfii</i> e neutrófilos recuperados de leite bovino	62
5.2.1 Viabilidade dos neutrófilos por exclusão em azul de Trypan.....	62
5.2.2 Produção de peróxido de hidrogênio e atividade específica de enzimas antioxidantes produzidas pelos neutrófilos	63
5.2.3 Atividade específica de enzimas antioxidantes produzidas pela <i>P. zopfii</i>	64
5.2.4 Capacidade fagocitária dos neutrófilos sobre a <i>P. zopfii</i>	65
5.2.5 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias da <i>P. zopfii</i>	68
5.3 Viabilidade da <i>P. zopfii</i> frente ao sistema AIA/HRP	68
5.3.1 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias da <i>P. zopfii</i>	68
5.3.2 Atividade específica de enzimas antioxidantes produzidas pela <i>P. zopfii</i>	71
5.3.3 Integridade de membrana da <i>P. zopfii</i> por exclusão em azul de Trypan.....	72
5.3.4 Integridade do DNA da <i>P. zopfii</i>	74
6 CONCLUSÕES	76
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 INTRODUÇÃO

No Brasil o leite é produzido por quase todas as regiões do país. Vários pequenos produtores de leite se distribuem por todo o território nacional e vivem da renda gerada desta atividade (CARVALHO; OLIVEIRA, 2006). Entretanto, as bacias leiteiras tradicionais se concentram em alguns Estados como Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Paraná e Rio Grande do Sul. A diversidade do processo produtivo do leite é grande e muitos produtores, especializados ou não, têm investido em tecnologia e diferenciado o seu produto, recebendo mais por volume produzido e também por qualidade (HOTT; CARVALHO, 2007).

O leite, considerado como um alimento nobre, possui em sua composição diversos nutrientes como proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas; além de fornecer elementos como ácido linoléico, esfingomielina, ácido butírico, β caroteno, vitaminas A e D, e cálcio, elemento fundamental ao organismo e que participa de diversas funções biológicas como a mineralização óssea (BUENO; CZEPIELEWSKI, 2008). Produtos lácteos em geral desempenham um papel importante para o homem praticamente em todas as fases da vida havendo, desta forma, grande preocupação em assegurar a integridade e a qualidade intrínseca do leite e seus derivados destinados ao consumo humano (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004). O leite pode ser contaminado por microrganismos a partir de dentro da glândula mamária, e depois de secretado, a partir da superfície exterior do úbere e tetos, da superfície de equipamentos e utensílios de ordenha e tanque (SANTOS; FONSECA, 2007).

Para a indústria leiteira, problemas com contaminação microbiológica acarretam prejuízos em termos de qualidade do leite, principalmente com relação à fabricação dos produtos lácteos fazendo com que a indústria se adapte às novas exigências do mercado consumidor (REIS et al., 2007) e que se preocupe com a segurança alimentar da população (PRATA, 1998). Segundo Reis et al. (2007), em vários países, é feito o pagamento diferenciado para produtores que investem em qualidade do leite beneficiando diretamente a indústria, o consumidor e o produtor. No Brasil, a remuneração extra ao produtor atualmente é realizada devido à implantação da Instrução Normativa nº 51 (BRASIL, 2002), de 18 de setembro de 2002, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que fixou os requisitos mínimos de qualidade para o leite cru nas propriedades rurais, incluindo na legislação brasileira os limites máximos para Contagem de Células Somáticas (CCS).

Para o pecuarista, em termos de produção, a sanidade animal pode ser considerada como um dos fatores mais importantes da criação. Diversos problemas sanitários surgem na bovinocultura de leite e as doenças infecto-contagiosas parecem ser as mais importantes como, por exemplo, as mastites. A mastite, definida pela *International Dairy Federation* (IDF, 1987), é uma inflamação da glândula mamária que pode ter várias causas, sendo a infecciosa a mais freqüente. A doença se caracteriza pelas modificações patológicas do

tecido glandular bem como por uma série de alterações físicas e químicas do leite (PALES et al., 2005). Além da redução na quantidade e alterações dos componentes do leite, pode haver inclusive a perda total da capacidade secretora da glândula (RIBEIRO et al., 2003).

Dentre os microrganismos patogênicos associados à mastite, infecções associadas à alga da espécie *Prototheca zopfii* têm causado grandes preocupações para os produtores de leite devido às lesões irreversíveis que ocorrem na glândula mamária e às limitações terapêuticas frente a esta infecção. Vacas infectadas por *P. zopfii* acabam sendo descartadas ou mantidas apenas para fins reprodutivos (COSTA et al., 1999; JÁNOSI et al., 2001a; KIRK; MELLENBERGER, 2002) e os prejuízos econômicos são intensificados em função do número de animais acometidos no rebanho, da redução da produção de leite e do produto contendo resíduos que chega às indústrias (JÁNOSI et al., 2001b). Já foi verificada a ocorrência de enterites humanas associadas ao consumo de queijo contaminado com *P. zopfii* (COSTA et al., 1998a) e Pore e Shahan (1988) sugerem que esta alga pode formar uma flora transitória no trato gastrointestinal de humanos e animais quando é ingerida por água ou alimentos contaminados, podendo inclusive se multiplicar, devido à sua resistência a degradação pelas enzimas digestivas, e ser eliminada pelas fezes contaminando o ambiente. Segundo MELVILLE et al. (1999), a *P. zopfii* é resistente à pasteurização e o consumo de leite e produtos lácteos contaminados com esta alga pode representar um dos meios de transmissão deste patógeno e aumentar seu potencial zoonótico.

A *P. zopfii* é um microrganismo resistente à maioria dos agentes antimicrobianos usados no tratamento de mastite (SHAHAN; PORE, 1991) e é muito difícil a cura de vacas infectadas (KAWAI et al., 2007). O uso prolongado de compostos antimicrobianos sintéticos tem levado à mutação e à seleção de microrganismos patogênicos resistentes, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (VARGAS et al., 2004). Estudos com produtos terapêuticos naturais e não convencionais têm sido realizados pela comunidade científica ao longo do tempo. Vários compostos estudados apresentam propriedades bioativas com resultados importantes tanto na medicina humana como na medicina veterinária. O ácido indol-3-acético (AIA), por exemplo, é um hormônio de planta que apresenta diversas propriedades químicas e bioquímicas, e quando combinado com a peroxidase de raiz forte (HRP), por exemplo, pode ter efeitos citotóxicos (GRECO et al., 2000; FOLKES; WARDMAN, 2001; WARDMAN, 2002; KIM; JEON; PARK, 2004).

Devido aos inúmeros prejuízos causados pela mastite associada à alga *P. zopfii* e ao fato da pesquisa sobre este microrganismo ainda ser emergente, foram realizados neste trabalho estudos bioquímicos sobre este microrganismo para melhor entender seus mecanismos biológicos e também foi avaliada uma possível ação antimicrobiana do sistema AIA/HRP sobre este patógeno.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção leiteira nacional

O sistema agroindustrial do leite é um dos mais importantes no agronegócio brasileiro. A atividade é praticada em todo território nacional em mais de um milhão de propriedades rurais (MARTINS, 2003). O Brasil atualmente supera os vinte e sete bilhões de litros/ano de leite produzidos (EMBRAPA, 2009) e a produção de leite brasileira representa aproximadamente 5% da produção mundial, o que torna o Brasil o sexto colocado no *ranking* de produção. Nas Américas, o Brasil é o segundo maior produtor de leite, com 16% da produção do continente, atrás apenas dos Estados Unidos (EMBRAPA, 2009). Na maioria dos estados brasileiros, o complexo agroindustrial do leite gera renda e uma quantidade expressiva de postos de trabalho (GOMES; FERREIRA FILHO, 2007).

A produção de leite no Brasil vem apresentando um crescimento significativo ao longo dos anos (PONCHIO et al., 2005) e tem passado por transformações que, segundo Gomes (2001), tem afetado a cadeia de produtos lácteos por diversos fatores como a liberação do preço do leite após quase meio século de tabelamento; maior abertura da economia brasileira ao mercado internacional devido à instalação do Mercosul; estímulo da demanda pelo aumento da renda do consumidor devido à estabilidade da economia brasileira com o Plano Real; crescimento da produção de leite longa vida (UHT); e a qualidade do leite como prioridade absoluta de todos os elos da cadeia produtiva. Segundo Barszcz, Lima e Kovaleski (2005) atualmente há uma constante busca pela qualidade na cadeia produtiva do leite no Brasil e as mudanças políticas e econômicas forçaram o setor a se adaptar às novas exigências de mercado por ter se tornado globalizado e competitivo, tendo como consequência a preocupação com a qualidade do leite.

2.2 Glândula mamária

2.2.1 Secreção do leite

A glândula mamária é um órgão que faz parte do sistema reprodutor de fêmeas mamíferas e a lactação pode ser considerada como a fase final do processo biológico de reprodução. Em fêmeas bovinas, a glândula mamária é dividida em quatro quartos mamários sendo cada quarto composto de um teto, cisternas, sistema de ductos e tecido secretório contendo alvéolos (Figura 1A). O canal do teto tem em torno de 8 a 12 mm de comprimento e a extremidade inferior mantém-se fechada por um anel de musculatura

circular lisa (esfíncter), que tem a capacidade de contrair impedindo a entrada de microrganismos (LISHMAN, 1995).

Os alvéolos são os componentes da glândula responsáveis pela produção do leite (Figura 1B). Segundo Lishman (1995) é uma estrutura microscópica, esférica em que do lado interno possui um espaço oco, o lúmen, e uma camada única de células epiteliais responsáveis pela secreção do leite. Externamente são revestidos por células mioepiteliais que através da ação de hormônios faz com que o leite que está no interior dos alvéolos seja pressionado fluindo para os ductos condutores. Geralmente a glândula de uma vaca em lactação possui acima de 5×10^{12} células secretoras no epitélio do tecido alveolar e são rapidamente repostas principalmente em picos de lactação. Cada alvéolo é envolvido externamente por uma rede de capilares sanguíneos que tem a função de levar anabólitos para a síntese do leite (LISHMAN, 1995).

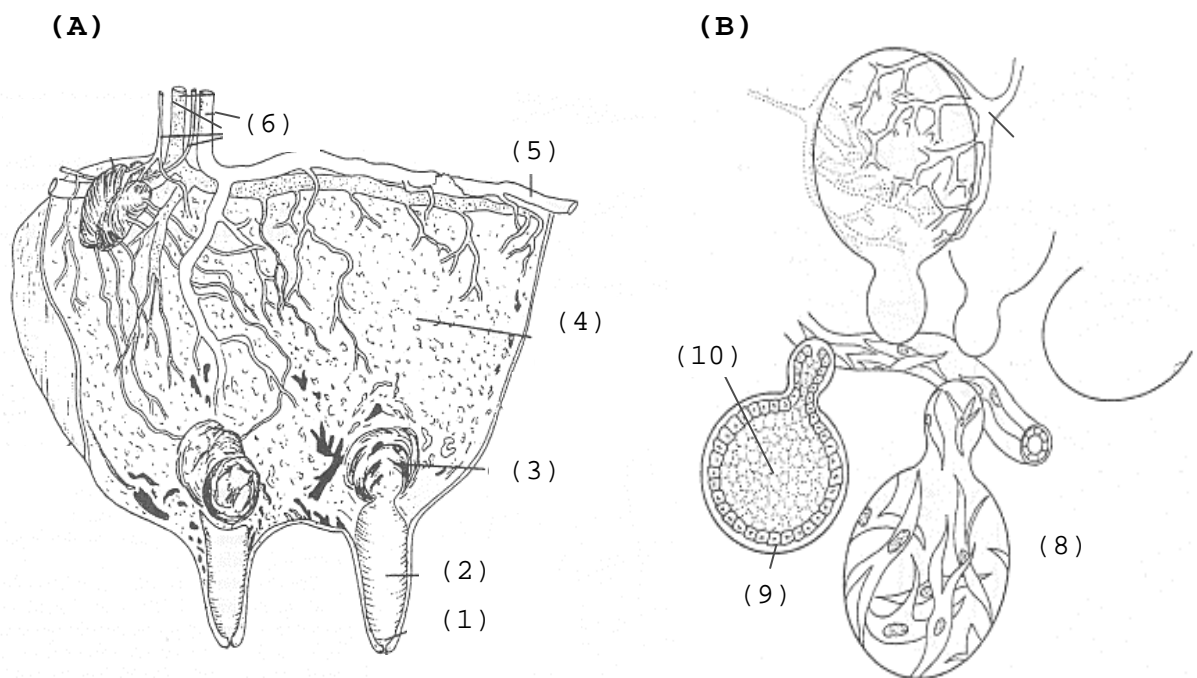


Figura 1 – Esquema ilustrativo (FRANDSON, 1986; WHITTEMORE, 1980) dos principais componentes da glândula mamária de uma vaca em lactação (A) e dos alvéolos secretores de leite (B). Legenda: (1) Canal do teto (2) Cisterna do teto, (3) Cisterna da glândula, (4) Tecido glandular, (5) Veia abdominal subcutânea, (6) Artéria, veia e vasos mamários, (7) Vasos capilares para suprimento de sangue, (8) Camada de células mioepiteliais, (9) Células epiteliais secretoras de leite e (10) Lúmen do alvéolo.

Componentes do leite como lactose, gordura e caseína são sintetizados pelas células epiteliais nos alvéolos. Já vitaminas, minerais e certas proteínas vêm da alimentação do animal, circulam pela corrente sanguínea e dos capilares atravessam a membrana plasmática das células epiteliais sendo secretados no leite. Normalmente a membrana plasmática das células epiteliais é extremamente seletiva, mas quando a glândula mamária está infectada por microrganismos, por exemplo, a seletividade se altera permitindo a passagem de células sanguíneas, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), para o interior do lúmen do alvéolo saindo no leite (LISHMAN, 1995).

Na glândula mamária o agente patogênico penetra pelo canal do teto quando os músculos do esfíncter relaxam, os quais geralmente são contraídos entre ordenhas (VALLE, 2005), e de 2 a 4 horas evolui para as cisternas do teto e da glândula (DEGASPERI; PIEKARSKI, 1988). Internamente, o teto é revestido por queratina que funciona como uma barreira por possuir agentes antimicrobianos como ácidos graxos, esterificados e não esterificados com ação bacteriostática, e proteínas catiônicas que se ligam eletrostaticamente aos patógenos alterando a estrutura da parede celular destes microrganismos e tornando-os susceptíveis à pressão osmótica, lise e morte (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROA, 1997); inclusive a remoção desta queratina pode aumentar a susceptibilidade da glândula mamária à invasão e colonização por patógenos.

2.2.2 Células somáticas

A saúde da glândula mamária é de enorme importância para toda a cadeia produtiva do leite e inúmeras situações relacionadas com a sua fisiologia são atualmente conceituadas, mas existe uma grande dificuldade em elucidar a fisiopatologia das infecções da glândula devido à complexidade das doenças, etiologias, formas clínicas, resposta fisiológica do animal, tratamento e controle (HARMON, 1994). A produção intensiva pode afetar profundamente a imunidade da glândula mamária e a capacidade do animal em resistir às mastites (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DEROA, 1997). Fonseca e Santos (2000) relatam que com a saúde da glândula mamária comprometida, aumenta um grande problema no setor que é a qualidade do leite devido à presença de altos índices de contagem de células somáticas e aos antibióticos oriundos do tratamento de animais doentes quando não se observa o período de completa eliminação dos mesmos.

No leite, as células somáticas consistem em diferentes tipos celulares, incluindo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos e uma pequena porcentagem de células epiteliais. Thiers (1999) relata que em uma glândula mamária em lactação e saudável, a contagem total gira em torno de 5×10^4 a 1×10^5 células somáticas (CS) por mililitro (mL) de leite e, durante uma infecção, o total pode aumentar acima de 1×10^6 CS/mL

de leite em pouco tempo. A contagem de células somáticas permitida para leite cru refrigerado tipo B, por exemplo, é de no máximo 6×10^5 CS/mL de leite (BRASIL, 2002). Inúmeros prejuízos são causados tanto ao produtor de leite quanto à indústria de laticínios pela presença da doença no rebanho e de células somáticas no leite acima dos níveis normais e, segundo Santos (2002), as maiores perdas estão relacionadas à redução da produção que acaba gerando problemas de captação da matéria-prima para a indústria. Fonseca e Santos (2000), relatam que estes prejuízos afetam também de forma direta a composição do leite diminuindo o tempo de vida de prateleira dos seus derivados.

2.2.3 Neutrófilos

Os neutrófilos, leucócitos polimorfonucleares (PMN), são as primeiras células da linha de defesa na resposta imune do hospedeiro a chegarem no local da inflamação para combater a invasão de patógenos. Os neutrófilos (Figura 2) são componentes essenciais do processo inflamatório agudo e são responsáveis pela tentativa de resolução da infecção microbiana (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

Durante infecções microbianas pode haver aumento em cerca de 10 vezes no número de neutrófilos circulantes à medida que forem liberados da medula óssea (TIZARD, 2002). A invasão da glândula mamária por microrganismos é normalmente seguida de um aumento no número de leucócitos no leite, a maioria neutrófilos. Essas células migram da corrente circulatória para a glândula e farão parte do grupo das células somáticas do leite.

Geralmente, o mecanismo normal da ação do neutrófilo consiste de vários processos que resultam em quimiotaxia, aderência (Figura 2), diapedese e opsonização, englobamento e destruição do microrganismo, sendo este processo denominado de fagocitose. Após a ingestão, com formação do fagossomo, inicia-se o processo de morte microbiana por agentes citotóxicos. Os agentes citotóxicos são tradicionalmente divididos em mecanismos oxigênio-independente e dependente, e ambos colaboram para a morte microbiana. O mecanismo oxigênio-independente contém enzimas como proteases e lipases características, proteínas e peptídeos antimicrobianos. Proteínas microbianas como as defensinas e a enzima lisozima, possuem a função de alterar a superfície aniônica dos microrganismos, deixando a membrana mais permeável. Proteases, como a elastase e as catepsinas, degradam proteínas microbianas que na maioria das vezes se constituem em fatores de virulência (MAYER-SCHOLL; AVERHOFF; ZYCHLINSKY, 2004).

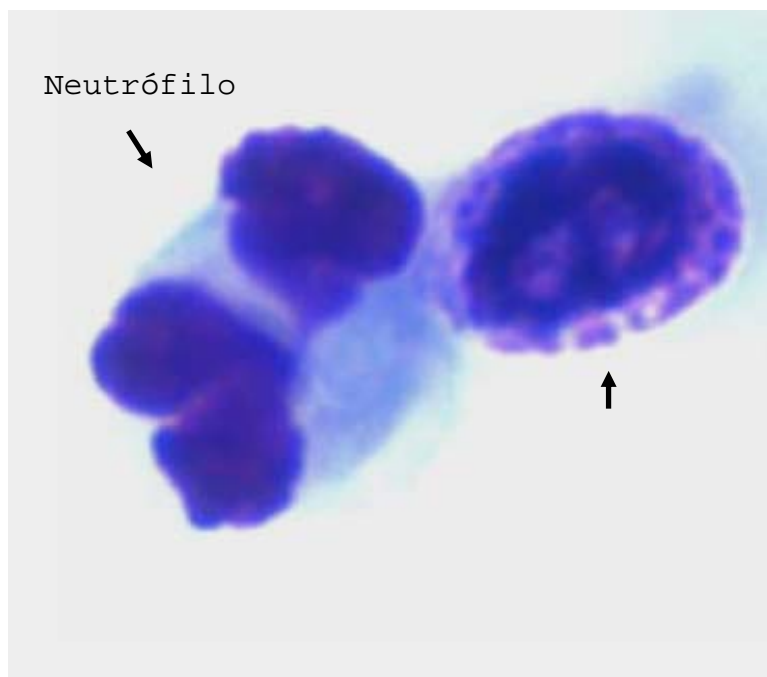


Figura 2 – Neutrófilo de leite bovino aderido ao microrganismo patogênico, utilizando a coloração Panótica (1000x), ilustrada por VALLE (2005).

No mecanismo de morte oxigênio-dependente, os neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO). Alguns compostos reativos são espécies não radicalares, não possuem um elétron desemparelhado na última camada, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxido orgânico (lipoperóxido, ROOH), ácido hipocloroso (HOCl), cátion *nitrosonium* (NO^+), ânion nitroxila (NO^-) e peroxinitrito ($OONO^-$) (DRÖGE, 2002; URSO; CLARKSON, 2003). Outros são também chamados de radicais livres, que tem como definição qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron não pareado ocupando um orbital externo, como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil (HO^{\cdot}), peroxil (ROO^{\cdot}), hidroperoxil (HOO^{\cdot}), alcoxil (RO^{\cdot}), oxigênio singlete ($^1\Delta gO_2$), óxido nítrico (NO^{\cdot}), dentre outros (KOHEN; NYSKA, 2002). Todos estes compostos podem resultar em uma seqüência de reações bioquímicas denominadas de explosão oxidativa.

2.3 Mastite

A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária que pode ter várias causas como estresse e ferimentos físicos, mas a doença causada por microrganismos é a mais freqüente. A infecção propicia perdas econômicas na cadeia produtiva do leite que compromete o lucro do produtor, a qualidade do produto final na indústria de lácteos e pode representar um risco à saúde pública (COSTA, 1998). As perdas relacionadas à mastite podem ser divididas em até 70% de redução na produção de leite, 14% de descarte

premature dos animais, 8% de descarte do leite após tratamento e 8% de despesas com medicamentos e atendimentos veterinários (PHILPOT, 1984).

A mastite infecciosa pode ser causada por inúmeros microrganismos (BRAMLEY; DODD, 1984) e classificada como clínica quando há sinais evidentes da doença no animal como edema, elevação da temperatura, endurecimento e dor da glândula mamária, além do aparecimento de grumos, pus ou alterações das características do leite. Já a mastite subclínica se caracteriza por alterações na composição do leite sem sinais visíveis de inflamação do úbere (CULLOR et al., 1993). No leite ocorre um aumento na contagem de células somáticas, aumento dos teores de cloreto de sódio, proteínas séricas e diminuição do percentual de caseína, gordura, sólidos totais e lactose (TOZZETTI et al., 2008). A mastite também pode ser classificada em contagiosa e ambiental, considerando-se as características do agente etiológico (FONSECA; SANTOS, 2000). Agentes ambientais são oportunistas, estão presentes no ambiente em que o animal vive e as infecções ocorrem em qualquer etapa do manejo; os contagiosos necessitam do animal para sobreviver, multiplicar-se dentro no interior da glândula mamária, no canal do teto ou sobre a pele e são transmitidos durante a ordenha.

Shepherd (1996) relata que um fator importante que contribui para a disseminação da doença de uma vaca para a outra é o equipamento de ordenha mal regulado e conservado inadequadamente, pois além de causar lesões nos tetos, pode abrigar microrganismos nas borrachas que são transportados pelo fluxo de leite. Segundo Valle (2005) a glândula mamária fica mais susceptível às infecções no início e final do período seco do animal devido à falta de assepsia dos tetos e mudanças histológicas levando às mastites clínicas nas primeiras semanas da próxima lactação (EBERHART, 1992; PANKEY; DRECHSLER, 1993; SORDILLO; NICKERSON, 1988).

Muitos microrganismos podem causar a mastite de origem infecciosa como bactérias, fungos, vírus e algas (WATTS, 1988; COSTA et al., 1993; CULLOR et al., 1993). Em 1988, Watts levantou 137 espécies diferentes de agentes causadores de mastite e as bactérias são as mais frequentemente isoladas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (HARMON, 1994). Outras espécies do grupo dos actinomicetos (*Actinomyces pyogenes*, *Nocardia asteroides* e *N. brasiliensis*), leveduras e fungos micelianos também podem ser isolados das infecções (McDONALD, 1984; SMITH; TODHUNTER; SCHONBERGER, 1985; LANGONI; DOMINGUES; SILVA, 1998; RIBEIRO, 2001).

Um dos patógenos muito estudados na etiologia da mastite bovina é o *S. aureus*, responsável por uma ampla variedade de enfermidades comumente adquiridas como infecções, intoxicações alimentares e síndromes sistêmicas. A prevalência de múltiplas classes de resistência aos antibióticos tem complicado os tratamentos, além de aumentar a

morbidez e a mortalidade associada com patologias estafilocócicas (BOZDOGAN; APPELBAUM, 2004; MEKA et al., 2004). Nos estados de São Paulo e Minas Gerais predominam as mastites causadas por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Corynebacterium* sp. (BALDASSI, et al., 1991; COSTA, 1998; COSTA et al., 1998b; LANGONI et al., 1991; NADER FILHO, 1985), sendo também estes os principais agentes etiológicos da mastite clínica nestes mesmos estados (COSTA et al., 1998a, BENITES et al., 1996).

2.3.1 Mastite bovina associada à *P. zopfii*

Há algum tempo vários estudos têm mostrado a incidência de mastite bovina associada a algas do gênero *Prototheca* sp. A espécie do gênero *Prototheca* mais encontrada na mastite bovina é a *P. zopfii* (PORE et al., 1983; MELVILLE et al., 1999; 2002). O gênero *Prototheca* foi descrito pela primeira vez em 1894 por Wilhelm Krüger e associado à mastite em 1952 por Lerche na Alemanha (COSTA et al., 1996a). No Brasil, o primeiro caso de infecção por *P. zopfii* associada à mastite bovina foi registrado em 1989 no Estado do Mato Grosso do Sul em uma vaca importada (COSTA et al., 1999). Outros casos foram registrados nos estados de São Paulo (COSTA et al., 1996a), Minas Gerais (BRITO; VEIGA, 1997), Paraná (FILIPPENSEN et al., 1999), Pernambuco (MOTA et al., 1999), Goiás (BUENO et al., 2006) e Rio Grande do Sul (GOMES; DRIEMEIER; FERREIRO, 1999). Segundo Corbellini et al. (2001) e Bueno et al. (2006) as *P. zopfii* têm tido um aumento na incidência nos estados de São Paulo e de Goiás. A mastite por *Prototheca* sp. também já foi relatada na Alemanha, Reino Unido, Dinamarca, Israel, Japão e Estados Unidos (VAZ et al., 2005) e em Portugal (MARQUES et al., 2006), não se tendo informações em outros países.

Sob o ponto de vista epidemiológico, a mastite associada à *P. zopfii* geralmente apresenta-se sob a forma de surtos e casos esporádicos. Melville (1995), avaliando a ocorrência de infecções intramamárias por *Prototheca* sp., encontrou o microrganismo em animais acometidos de 18 propriedades em um total de 54 (33,3%) e em 14 municípios em um total de 35 (40%) nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. A mesma autora verificou a ocorrência de surtos de mastite bovina por *Prototheca* sp. e encontrou, em um total de 470 animais, 119 animais infectados pelo microrganismo (25,31%); e ainda verificou a ocorrência de casos esporádicos em 12 propriedades, encontrando em um total de 2.162 animais, 31 animais infectados (1,43%). Segundo a autora, estes dados apontam um problema tanto sob o aspecto econômico como de saúde pública, tendo em vista a relevante ocorrência do microrganismo nas regiões estudadas.

As mastites associadas à *P. zopfii* acarretam queda na produção láctea, endurecimento da glândula mamária e presença de grumos no leite, e pelo risco de

disseminação do microrganismo para outros animais, é recomendado, inclusive, o descarte do animal acometido uma vez que este se torna economicamente desinteressante (KIRK; GLENN; RUIZ, 2000). Esta infecção pode ocorrer em um ou mais quartos mamários, sem sintomas sistêmicos (COSTA et al., 2001; MELVILLE et al., 2002). Segundo VAZ et al. (2005), na glândula mamária de uma vaca, a infecção por *P. zopffii* causa lesões histológicas graves, sendo possível, inclusive, a observação das algas no lúmen dos alvéolos e no interstício do tecido do úbere, levando à atrofia alveolar (CORBELLINI et al., 2001) e a uma infecção crônica, com persistente eliminação do microrganismo no meio ambiente (ROESLER; HENSEL, 2003; ROESLER; SCHOLZ; HENSEL, 2003). Em casos crônicos podem ser diagnosticadas necrose, proliferação fibroblástica e atrofia alveolar (CORBELLINI et al., 2001; JÁNOSI et al., 2001b; BUENO et al., 2006).

Todos os estágios produtivos de uma vaca podem ser igualmente susceptíveis à infecção por *P. zopffii* (McDONALD et al., 1984; FURUOKA et al., 1989) e a mais alta incidência ocorre nas primeiras semanas de lactação e principalmente no verão (JÁNOSI et al., 2001a). Também há relatos de casos durante o período seco (COSTA et al., 1996b). As *P. zopffii* podem ser isoladas dos casos de mastites clínicas e subclínicas e ocorre de forma esporádica e epidêmica, principalmente em propriedades em que se tem condições inadequadas de manejo e higiene (COSTA et al., 1996a; 1996b), como a manutenção dos animais em ambientes barrentos. Costa et al. (1998b) observaram que falhas no *pré-dipping* (procedimento de desinfecção dos tetos antes da ordenha) e *pós-dipping* (imersão dos tetos em solução desinfetante para proteção dos tetos contra microrganismos causadores da mastite), na permanência dos animais em pé após a ordenha e instalações em *free-stall*[†] estavam relacionados com maior ocorrência de mastite por *P. zopffii*.

Anderson e Walker (1988) e Pore e Shahan (1988) consideram a *P. zopffii* um patógeno oportunista e infreqüente, que causa a doença se a resistência do hospedeiro estiver prejudicada e sua disseminação ocorre em consequência das contaminações do ambiente. Bexiga, Cavaco e Vilela (2003) relatam que microrganismos do gênero *Prototheca* sp. têm sido considerados como causa emergente de mastites em fêmeas bovinas e são muitas vezes subdiagnosticados, o que acarreta inúmeras perdas. Os animais afetados tornam-se disseminadores da doença por isso o descarte do animal acaba sendo a única solução do produtor como a melhor forma de controle. Segundo Vaz et al. (2005), em animais de elevado nível genético, recomenda-se a cauterização do quarto mamário infectado, por isso o diagnóstico rápido da infecção por *P. zopffii* é fundamental para a

[†] Instalações em *free-stall* são constituídas de uma área em galpão, destinada ao descanso das vacas, em que são adaptadas baias de contenção com dispositivo para controle da disposição de dejetos em fosso (CARNEIRO, 1989).

prevenção e o controle serem implementados o mais breve possível (COSTA et al., 1996a, 1996b).

As *P. zopfii* possibilitam a contaminação de alimentos (COSTA, 1998) resistindo, inclusive, ao cloreto de sódio em concentração de até 6% e ao pH no intervalo de 2,1 a 10,5 (JÁNOSI et al., 2001a). Costa et al. (1998a) relataram o isolamento de *P. zopfii* em paciente que apresentou distúrbio gastrointestinal após o consumo de queijo fresco produzido com leite de vaca contaminado e, de acordo com Jánosi et al. (2001a), a *P. zopfii* demonstra não ser afetada pelo processo digestivo devido à estrutura da parede celular do microrganismo. Ainda, segundo Melville et al. (1999), a *P. zopfii* é resistente à pasteurização e o consumo de leite e produtos lácteos contaminados com *Prototheca* sp. podem representar um risco a saúde e se tornar um meio de transmissão de zoonoses (IACOVIELLO et al., 1992).

2.3.2 Características gerais da *P. zopfii*

A posição taxonômica do gênero *Prototheca* tem sido muito discutida ao longo do tempo e foi classificada como Ramo *Eukaryota*, Reino *Viridiplante*, Filo *Chlorophyta*, Classe *Chlorophyceae*, Ordem *Chlorellales*, Família *Chlorellaceae* e Gênero *Prototheca* (RAPUNTEAN et al., 2009). A *Prototheca* é considerada uma alga aclorofilada (PORE, 1983), mutante do gênero *Chlorella* e muitos autores acreditam que esta perda da capacidade de sintetizar clorofila fez com que esta alga se tornasse heterotrófica (LAGNEAU, 1996) e, assim, conferido um potencial patogênico à espécie (COSTA et al., 1996a). Crispin (1999) verificou que *P. zopfii* produz proteases e estas exoenzimas poderiam estar associadas à sua virulência. Do gênero *Prototheca* são reconhecidas as espécies *P. zopfii*, *P. wickerhamii*, *P. stagnora*, *P. ulmea*, *P. moriformis* e, mais recentemente, a *P. blaschkeae* (ROESLER et al., 2006; LASS-FLORL; MAYR, 2007; MARQUES et al., 2008).

Morfologicamente a *P. zopfii* é imóvel, aeróbia, esférica ou oval com diâmetro variável entre 7 e 30 μm (BUENO et al., 2006), requerem oxigênio para crescimento, temperatura ótima varia de 20 a 37°C e toleram ampla variação de pH, de 4,5 a 8,0 (PORE et al., 1983). Em provas bioquímicas a *P. zopfii* apresenta resultados positivos para assimilação de glicose, n-propanol e glicerol, negativos para sacarose e trealose, e variáveis para galactose (JÁNOSI et al., 2001a). Possui reprodução assexuada onde o esporângio, célula-mãe se divide internamente e forma entre duas e 16 células-filhas chamadas de esporangiósporos ou endósporos. Os endósporos são envolvidos por uma cápsula trilaminar de esporopolenina até ser rompida e, assim, liberados no ambiente (PORE, 1985; JÁNOSI et al. 2001a).

As espécies do gênero *Prototheca* são encontradas livres no ambiente em solo úmido e rico em matéria orgânica como lama e fezes (HUERRE et al., 1993; COSTA et al., 1996a). Estes microrganismos já foram isolados a partir de vários hospedeiros como suínos, ratos, bovinos, eqüinos, cães, gatos, peixes e animais silvestres que são portadores assintomáticos e disseminam a alga através de suas fezes no ambiente (PORE et al., 1983; PORE; SHAHAN, 1988). *P. zopfii* foi isolada de diversos processos infecciosos incluindo humanos (DAVIES; SPENCER; WAKELIN, 1964; VENEZIO et al., 1982). Em pacientes imunodeprimidos já foram relatados problemas como bursite, peritonite e lesões cutâneas relacionadas com infecções por *Prototheca wickerhamii*, mas observaram que a *P. zopfii* também pode estar envolvida com estas doenças (PORE et al., 1983; MELVILLE, 1999).

2.3.3 Caracterização molecular da *P. zopfii*

Classificações e diferenciações da *P. zopfii* em biotipos baseadas em características fenotípicas, análises auxonográficas e bioquímicas foram realizados por Blaschke-Hellmessen, Schuster e Bergmann (1985) e Roesler, Scholz, Hensel (2003). Em seguida, estudos baseados na análise da sequência do gene da subunidade 18S do DNA ribossomal da *P. zopfii* e nas variações da espécie, Roesler, Scholz, Hensel (2003) classificaram o microrganismo em três biotipos, genótipo 1, GenBank n°. AY973040; genótipo 2, GenBank n°. AY940456; e genótipo 3, GenBank n°. AY973041. Através das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), verificaram que um fragmento de 165 pares de base (pb) caracterizava o genótipo 2 da *P. zopfii* relatando que somente este biotipo estava associado à mastite bovina (ROESLER et al., 2006; MÖLLER et al., 2007), enquanto o biotipo 1 estava associado à presença da alga no ambiente da fazenda e o biotipo 3 em infecções humanas.

Em 2006, Roesler et al., após estudos filogenéticos das sequências da subunidade 18S do DNA ribossomal, encontraram características moleculares que distanciaram o genótipo 3 dos genótipos 1 e 2 levando-os, então, a reclassificarem o genótipo 3 da *P. zopfii* em uma nova espécie, a *P. blaschkeae* sp. nov.. Ainda, Roesler et al. (2006) sugeriram diferenciar os genótipos 1 e 2 da espécie *P. zopfii*, respectivamente, como duas novas subespécies, a *P. zopfii* subsp. *occulta* e a *P. zopfii* subsp. *bovimastitogenes*. Estudos também foram realizados no Japão por Osumi et al. (2008) e associaram ao genótipo 2 da *P. zopfii* todos os isolados de mastite e alguns isolados da água de bebedouro, esgoto e fezes, explicando que este resultado se deve às algas do gênero *Prototheca* encontrarem-se distribuídas na natureza, principalmente em locais úmidos e ricos em matéria orgânica.

Contudo, Marques et al. (2008), através da amplificação (PCR) das subunidades 18S do DNA ribossomal, análises de restrição do rDNA e análises filogenéticas, analisaram 41 isolados de *P. zopfii* recuperadas de mastite em rebanhos do norte de Portugal, e

identificaram 37 isolados de mastite da espécie *P. zopfii* var. *hydrocarbonea* e quatro isolados da espécie *P. blaschkeae* (genótipo 3), demonstrando pela primeira vez o envolvimento desta espécie em infecções de glândula mamária bovina. Também, na Bélgica, Aouay et al. (2008) encontraram 27 isolados do genótipo 2, três isolados do genótipo 3 e nenhum isolado do genótipo 1 em amostras de leite coletadas de vacas com mastite associada à prototecose.

Roesler et al. (2006) sugeriram que fossem feitos estudos de genotipagem da *P. zoffii* em outros países como, por exemplo, no Brasil, por apresentar rebanhos com mastite associada a este microrganismo. Caracterizar os biotipos da *P. zopfii* associados à mastite bovina é importante para se ter informações epidemiológicas sobre a doença e estabelecer possíveis estratégias de controle baseados nas características de cada espécie e subespécie de microrganismo.

2.4 Estresse oxidativo e defesa antioxidante

Situações em que os sistemas antioxidantes e os de reparo não reduzem os níveis de espécies reativas estabelece-se o estado denominado de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O estresse oxidativo pode ocorrer tanto pelo aumento na formação destas espécies reativas quanto pela queda na capacidade antioxidante celular (TRAVACIO; LLESUY, 1996), e a consequência da instalação desse processo é a perda das funções celulares que podem, inclusive, ocasionar a sua morte. As espécies reativas são extremamente instáveis, eles podem atacar alvos celulares diversos com o objetivo de estabilizarem sua estrutura molecular.

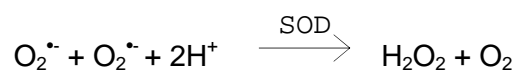
Diversas espécies reativas causam danos oxidativos. Normalmente, durante a respiração celular, a redução do oxigênio nas mitocôndrias produz H_2O como único produto final da reação (VOET et al., 2005), e este processo redutor contribui com a utilização de 95 a 98% do oxigênio total consumido pelas células. Contudo, cerca de 2 a 5% do oxigênio consumido na cadeia respiratória inicia a formação de espécies reativas de oxigênio (JENKINS; GOLDFARB, 1993), e o radical ânion superóxido é a primeira das espécies formadas pela redução unieletrônica do oxigênio molecular, conseqüentemente dando origem a outras espécies, como radical hidroxil e peróxido de hidrogênio que levam à oxidação de biomoléculas. Há evidências que a membrana mitocondrial é quantitativamente, a mais importante fonte de $O_2^{\cdot-}$ nos organismos (DRÖGE, 2002).

O radical hidroxil é a espécie com o maior poder oxidante em sistemas biológicos, com um tempo de vida extremamente curto (1×10^{-9} s) e com alta reatividade a uma grande variedade de moléculas orgânicas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar (ROVER JÚNIOR, 2001; YU, 1994). Este radical pode iniciar a oxidação de

ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) e, também, quando produzido próximo a um DNA complexado a um metal, ferro e cobre, por exemplo, este radical se combina com extrema rapidez ao elemento ou até mesmo a outros radicais, levando à mutação, inativação e danos no material genético. Assim, a determinação da fragmentação de DNA pode ser uma das formas de detecção do grau de estresse oxidativo.

Reações de dismutação do ânion superóxido (a), catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), forma peróxido de hidrogênio que na presença de ferro ou cobre conduz as reações de *Fenton* (b) e *Haber-Weiss* (c) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) gerando radical hidroxil, como descritas nas seguintes equações:

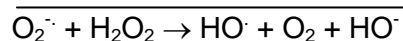
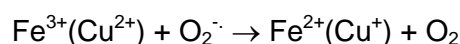
(a) Dismutação do ânion superóxido:



(b) Reação de *Fenton*:



(c) Reação de *Haber-Weiss*:



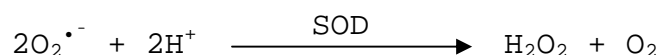
As espécies reativas de oxigênio (ERO) estão envolvidas em vários processos fisiológicos e em vários eventos patológicos como carcinogênese, envelhecimento, arterosclerose, danos por radiação, inflamação, *diabetes mellitus*, doenças neurodegenerativas, injúrias tóxicas, incluindo toxicidade aguda e crônica por álcool (DAS; VASUDEVAN, 2007). As ERO podem agir sobre importantes estruturas celulares e em consequência pode ocorrer a oxidação dos fosfolípidos de membranas celulares, DNA e proteínas (PACKER, 1997). A membrana celular é um dos primeiros alvos das espécies reativas, e sua função é vital para a célula; as membranas que revestem organelas intracelulares como mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo, entre outras, apresentam componentes bilipídicos, proteínas e carboidratos, que também podem ser atacadas por ERO e ERN (AYDIN, 2006). Ácidos graxos presentes nas membranas biológicas podem ser oxidados pelas ERO, processo chamado de peroxidação lipídica, o que resulta em alterações de permeabilidade e seletividade da membrana, liberação de enzimas hidrolíticas de organelas como os lisossomos e formação de produtos citotóxicos ocasionando a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Espécies reativas também podem gerar efeitos benéficos. No sistema de defesa contra uma infecção, os fagócitos estimulados produzem ERO com o objetivo de destruir patógenos (POULSEN et al., 2000; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Como exemplo, durante a inflamação da glândula mamária é produzido peroxinitrito (ONOO^-), produto da reação do ânion superóxido e óxido nítrico gerados pela explosão respiratória das células de defesa, e considerado como o agente mais citotóxico na defesa contra a infecção (PAAPE; CAPUCO, 1997). Os microrganismos, por sua vez, expostos a altos níveis de ERO, podem desenvolver sistemas de defesa através de enzimas contra tais espécies, que conjugados aos sistemas de reparo reduzem e/ou inibem a ação das ERO contribuindo para a manutenção da integridade das macromoléculas. Ainda, Gonzalez (1992) relata que a peroxidação lipídica pode controlar divisão celular, importante para o controle do crescimento de células tumorais.

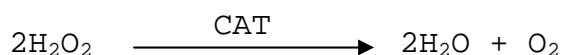
A geração de espécies reativas *in vivo* é um fenômeno constante, por isso existem mecanismos de controle formados pelos antioxidantes capazes de competir com substratos oxidáveis e, conseqüentemente, inibir ou atrasar o processo de oxidação (DRÖGE, 2002). Os antioxidantes protegem as células contra os efeitos das ERO e podem ser classificados em dois grupos: os enzimáticos e os não-enzimáticos (SIES, 1993). O sistema enzimático é constituído por várias enzimas como a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona Peroxidase (GPx) e Glutaciona Redutase (GR); e o não-enzimático pode ser classificado como endógeno (bilirrubina, melatonina, ácido úrico, coenzima-Q e outros produtos metabólicos) e exógenos (α -tocoferol, ácido ascórbico, polifenóis, selênio e outros obtidos através da dieta) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004). Altas atividades de enzimas antioxidantes são indicadoras de estresse oxidativo quando comparadas a valores basais para um dado tipo celular e/ou microrganismo.

Os antioxidantes fazem parte da primeira linha de defesa contra a toxicidade das ERO (RODRIGUEZ et al., 2004) e cada enzima é responsável por uma ação protetora específica. A mitocôndria é altamente rica em antioxidantes, incluindo glutaciona reduzida (GSH) e enzimas, assim como SOD e GPx, que estão presentes em ambos os lados das suas membranas, com a finalidade de minimizar o estresse oxidativo na organela (RODRIGUES, 2007). As enzimas que atuam como detoxificadora de forma profilática dos agentes antes de causar a lesão são CAT, SOD, GPx e os metabólitos Glutaciona Reduzida (GSH) e Vitamina E; e as enzimas que têm a função de reparar a lesão ocorrida são GR, GPx e os metabólitos ácido ascórbico e GSH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A SOD pode ser encontrada como isoenzima Cu-Zn-SOD atuando principalmente no citosol e como Mn-SOD na matriz mitocondrial (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; 1999). A SOD reduz o radical superóxido (SIES, 1993; HALLIWELL, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999) para formar H_2O_2 e oxigênio conforme mostrado na seguinte equação:



A CAT é uma enzima encontrada basicamente nos peroxissomas das células e possui em sua estrutura o Fe^{3+} , que compõem o grupo prostético heme da proteína, fundamental para que ocorra a reação catalítica. A equação abaixo mostra a reação da catalase que reduz o H_2O_2 em água e oxigênio (SIES, 1993; HALLIWELL, 1994; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).



A GPx e a GR são enzimas que agem em conjunto eliminando os hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (Figura 3), e estão distribuídas no citosol e na mitocôndria das células (JI; STRATMAN; LARDY, 1988). A GPx apresenta um resíduo de cisteína que contém selênio covalentemente ligado e sua atividade está relacionada ao consumo do co-substrato GSH que é convertido em Glutathiona Oxidada (GSSG). A regeneração do GSH no meio celular é efetuada pela GR tendo como agente redutor o NADPH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

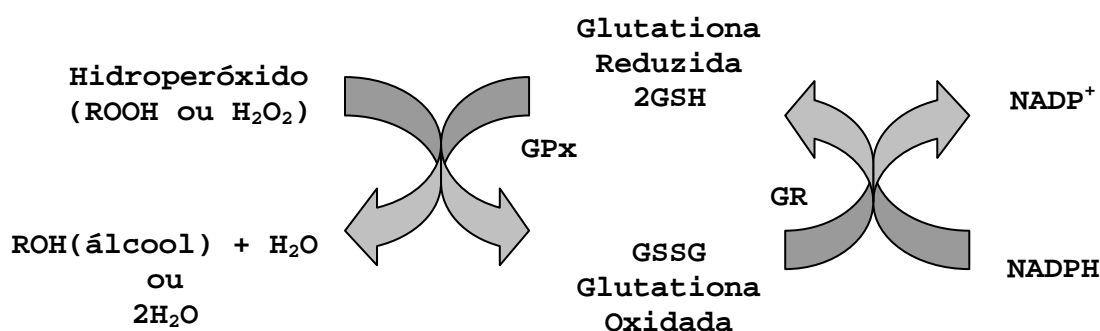


Figura 3 - Esquema demonstrando a eliminação de hidroperóxidos através das enzimas Glutathiona peroxidase (GPx) e Glutathiona redutase (GR) agindo sobre o substrato glutathiona.

2.5 Sensibilidade da *P. zopfii* aos antimicrobianos

A administração prolongada de compostos antimicrobianos sintéticos tem levado à seleção e resistência de microrganismos patogênicos mutantes (VARGAS et al., 2004). Além do tratamento da mastite se tornar refratário aos agentes antimicrobianos sintéticos devido à resistência do patógeno, a presença de antibióticos no leite se torna outro grande problema para a indústria, principalmente medicamentos à base de penicilina, pois podem

inibir, por exemplo, a produção de manteiga e principalmente os fermentos de iogurtes e queijos (TRONCO, 1997). Produtos terapêuticos naturais e não convencionais podem se tornar uma alternativa viável no combate às infecções por apresentarem propriedades bioativas. Vargas et al. (2004) encontraram atividade antibacteriana *in vitro* de extrato alcóolico de própolis a 50% na inibição em 67,7% do crescimento de *Nocardia asteroides*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* associadas à mastite bovina.

A *P. zopfii* não responde ao tratamento com os antibióticos disponíveis comercialmente e freqüentemente utilizados para tratamento de mastites. Contudo, alguns compostos químicos parecem ter efeito *in vitro* sobre a *P. zopfii*. Melville et al. (2002), citam que o nitrato de prata, a clorexidina e o sulfato de cobre lesam o microrganismo, podendo ser utilizados no *pré-dipping* (clorexidina) e na cauterização dos quartos mamários infectados (nitrato de prata). Buzzini et al. (2004) relatam que antibióticos como anfotericina B e nistatina, usados na terapia da prototecose humana, apresentaram atividade *in vitro* contra a espécie *P. zopfii*, enquanto Bexiga; Cavaco; Vilela (2003) verificaram alguma sensibilidade somente em relação à gentamicina, canamicina e polimixina B. De acordo com McDonald, Richard e Anderson (1984) todas as cepas de *P. zopfii* estudadas foram susceptíveis à mixina e nistatina, e apenas 45,8% das cepas à anfotericina B, 43,8% à polimixina B, 37,5% à gentamicina e somente 2,1% à canamicina. Estudos realizados por Marques et al. (2006) mostraram que a nistatina foi mais eficiente que anfotericina B na inibição do crescimento da *P. zopfii*. Embora resultados indicarem sensibilidade do microrganismo aos compostos, ainda não se tem certeza sobre o uso destas drogas como terapia nos animais.

Com relação aos produtos naturais, Brito e Veiga (1997) avaliaram a susceptibilidade *in vitro* da *P. zopfii* utilizando um extrato de sementes de frutas cítricas obtido comercialmente, através do tratamento em doses diárias por via intramamária em vacas infectadas, e encontraram redução dos microrganismos no leite após sete dias de tratamento e a completa eliminação após 39 dias de uso. Deuschle et al. (2006) encontraram atividade antimicrobiana de extrato etanólico de catião-trepador (*Senecio desiderabilis* Vell.) contra *P. zopfii* e Tortorano et al. (2008) usou óleos essenciais de plantas para inibição do crescimento *in vitro* de vários isolados de *Prototheca* sp.. Antimicrobianos de origem natural podem ser uma alternativa eficaz e econômica para resolver problemas causados pelos antibióticos convencionais e é de grande interesse a geração de novos compostos para combater infecções associadas à *P. zopfii*.

2.6 Ácido indol-3-acético (AIA) e peroxidase de raiz forte (HRP)

2.6.1 AIA

Os vegetais e animais têm grande parte do seu metabolismo controlado por hormônios. Os fitormônios são compostos que agem em muitos fenômenos vegetais e os principais são as giberelinas, ácido abscísico, etileno e as auxinas (ROLCIK et al., 2005). O ácido indol-3-acético (AIA) é uma das auxinas naturais mais importantes e é sintetizado principalmente no meristema apical em folhas jovens e é transportado do ápice até as extremidades das raízes (SANCHES et al., 2009; WACHOWICZ; CARVALHO, 2002). Pressupõe-se que exista mais de uma via para biossíntese do AIA (Figura 4), mas a via dependente do aminoácido triptofano é bem conhecida, sendo o AIA formado pela ação da monoamina-oxidase mediada pela desaminação oxidativa de triptamina (ROSA, 2002).

Em plantas, as auxinas ligam-se a uma proteína solúvel e o complexo formado associa-se a um receptor de membrana que aumenta a plasticidade da parede celular e altera a sua permeabilidade, e modifica os padrões respiratórios e o metabolismo de ácidos nucléicos (BARBIER-BRYGOO, 1995; TONIOLLI et al., 1996; GALSTON; PURVES, 1960). O AIA também é produzido em células animais (GORDON et al., 1972; MILLS et al., 1991) e pode ser encontrado, por exemplo, na urina de seres humanos como um produto de metabolismo do triptofano e no líquor (HU; DRYHURST, 1997), sangue (MARTINEZ et al., 1993), e em órgãos como pulmão, rim, fígado, e cérebro (TUSSELL et al., 1984; WEISSBACH et al., 1959).

Estudos relatam ações benéficas do AIA sobre células por possuírem propriedade antioxidante (CANO et al., 2003). A ação do AIA sobre a conservação de espermatozoides de caprinos e aumento da motilidade e incremento de fertilidade foram observados por Nunes e Combarous (1995), e também por Toniolli et al. (1996) em sêmen de suíno. O efeito benéfico do AIA também foi observado por Lins et al. (2006) quando encontraram um aumento de 51% da atividade fagocitária de neutrófilos por partículas de zymosan[‡] em ratos que receberam AIA por via subcutânea, não alterando a geração de H₂O₂ pela administração da auxina. A administração intragástrica de AIA não apresenta toxicidade para ratos segundo Pugine et al. (2007) e Oliveira et al. (2007), ou camundongos (MOURÃO, 2007).

O AIA está presente em alguns microrganismos em baixas concentrações. Bactérias do solo, tais como *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Agrobacterium* e *Rhizobium* sintetizam o AIA para promover o crescimento da sua planta hospedeira e participar em interações

[‡] Polissacarídeo derivado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae* usado em estudos fisiológicos e imunológicos (XAVIER et al., 2005).

patogênicas (LAMBRECHT et al., 2000). Bianco et al. (2006) relatam a presença do AIA como regulador do metabolismo celular em *Escherichia coli* e em baixas concentrações induz a filamentação de *Saccharomyces cerevisiae*, porém em altas concentrações inibe seu crescimento (PRUSTY; GRISAFI; FINK, 2004).

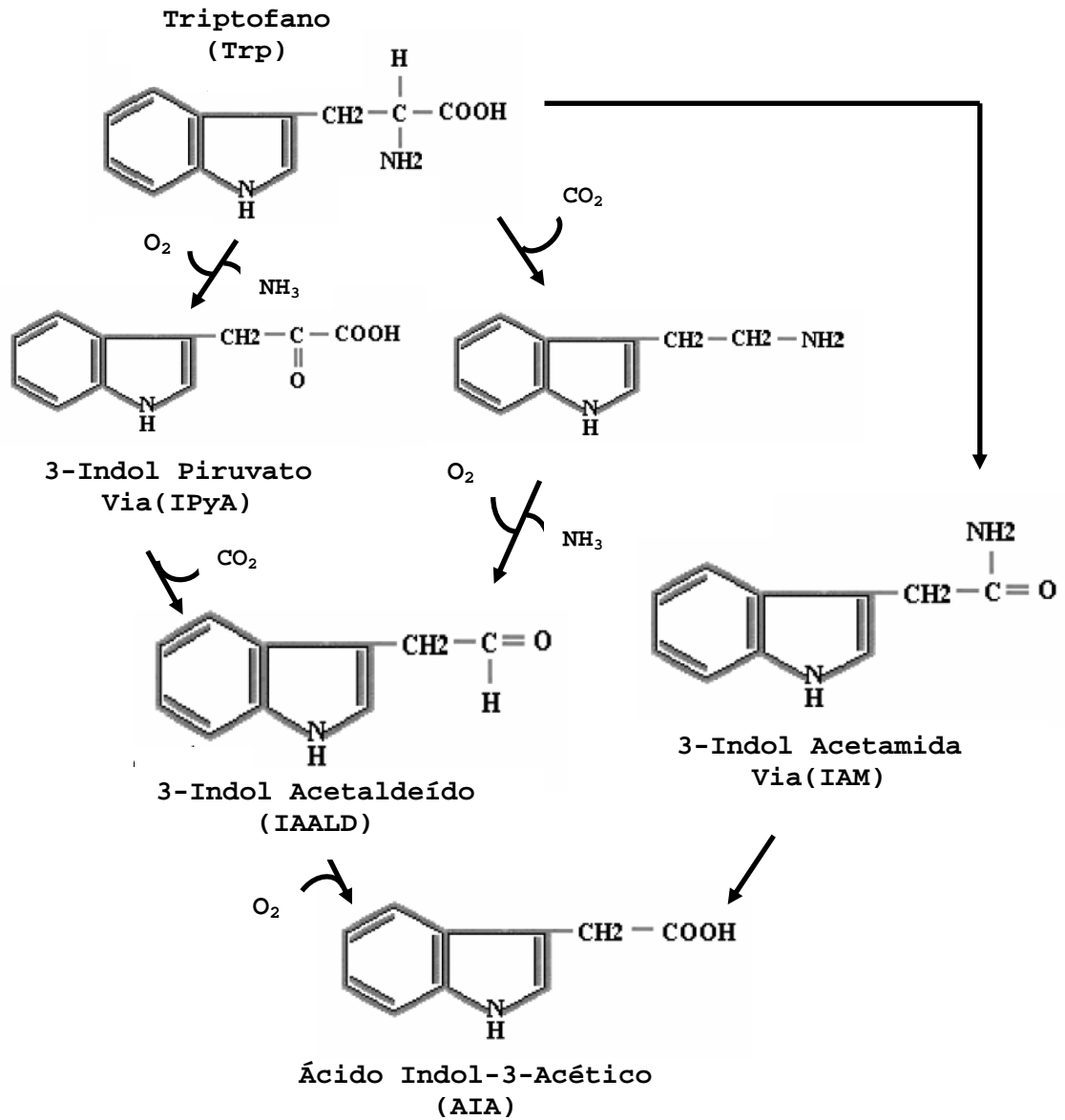


Figura 4 - Biossíntese do ácido indol-3-acético a partir do aminoácido triptofano. Adaptado de Marchioro (2005).

Junior et al. (2004) confirmaram a capacidade da produção de AIA por isolados de *Azospirillum amazonense* essencial na promoção do crescimento de pastagem de *Brachiaria* principalmente em solos de baixa fertilidade. Por outro lado, Morshed et al. (2005)

encontraram efeito bactericida e bacteriostático do AIA e outros fitormônios no combate de microrganismos gram-positivos e gram-negativos causadores de doenças.

2.6.2 Peroxidases

Uma peroxidase vegetal que tem atraído a atenção dos pesquisadores é a peroxidase de raiz forte (HRP), extraída da planta “rábano silvestre (*Armoracia rusticana*)”, devido à sua facilidade de obtenção, especificidade, características cinéticas e pelas diversas aplicações que podem ser dadas a esta enzima (ALONSO LOMILLO; KAUFFMANN; ARCOS MARTINEZ, 2003). Veitch (2004) relata que a HRP apresenta ótima estabilidade a 37°C, facilidade em ser conjugada com anticorpos e polímero, alta atividade em meio neutro e ausência de toxicidade.

A HRP está envolvida em diversas reações biológicas como reações de oxidação, processos de diferenciação celular, controle de funções metabólicas, dentre outras (SRIVASTAVA; VAN HUUSTEE, 1977; HAMMERSCHMIDT; NUCKLES; KERE, 1982; O'BRIEN, 2000; RAMAMURTHY et al., 2000). A mesma enzima pode estar envolvida em ligações de polissacarídeos, ligação de monômero, cicatrização de ferimentos, defesa de patógenos, regulação da elongação das células, polimerização da acrilamida, branqueamento de corante e também a oxidação do AIA (DURÁN; BROMBERG; KUNZ, 2001; VEITCH, 2004; HIRAGA, 2001). As peroxidases também participam da polimerização de fenil propanóides que iniciam a síntese de lignina e outros compostos fenólicos (BAUCHER et al., 1998) e dos flavonóides que possui atividade antioxidante que previnem o envelhecimento celular (HOUGHTON et al., 1995).

Na Figura 5 pode ser observado o ciclo da oxidação da HRP com a formação das suas diferentes formas: nativa, HRP-I, HRP-II, HRP-III e forma ferrosa (PUGINE, 2008; RODRIGUES, 2007; BERGLUND et al., 2002; DUNFORD, 1991; DUNFORD, 1999). Na estrutura da HRP é encontrado um grupamento heme, a ferriprotoporfirina IX, com quatro nitrogênios pirrólicos ligados ao ferro (FOLKES; WARDMAN, 2001). A peroxidase atua sobre seus substratos através de um ciclo dependente de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos (DUNFORD, 1991). No ciclo clássico da peroxidase, a HRP nativa é oxidada pelo peróxido de hidrogênio formando a HRP-I (1), que através de substratos redutores (RH) ocorre a redução da HRP-I a HRP-II (2) e da HRP-II para a forma nativa novamente (3). A forma ferrosa altamente reativa é formada também por um substrato redutor a partir da forma nativa da peroxidase (4). Observa-se ainda, a formação da HRP-III a partir da reação entre a forma ferrosa da enzima e o oxigênio (5); da reação entre a HRP nativa e o ânion superóxido (6); ou a partir da HRP-II na presença de H₂O₂ (7) (BERGLUND et al., 2002).

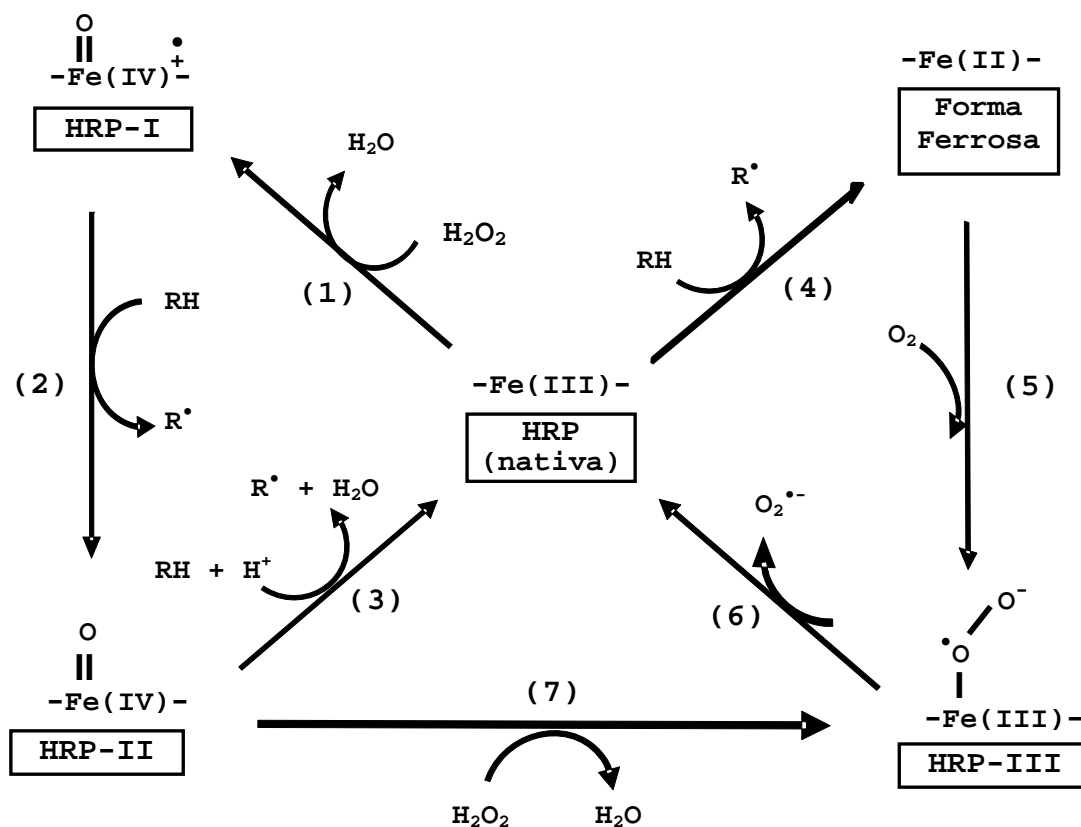


Figura 5 – Ciclo catalítico da HRP dependente de peróxido de hidrogênio mostrando suas diferentes formas e a geração de espécies reativas. Adaptado de Berglund et al. (2002).

De uma forma geral, as peroxidases são enzimas encontradas em todos os seres vivos, tecidos vegetais, animais, e também em microrganismos (BRUNETTI; FARIA-OLIVEIRA, 1996). Uma peroxidase de mamífero que possui um papel fundamental na defesa contra infecções, é a mieloperoxidase (DUNFORD, 1999) e os neutrófilos utilizam esta enzima e o substrato ânion superóxido para matar microrganismos (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998). As principais rotas da reação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ com a mieloperoxidase são mostradas na Figura 6. A maior atividade da mieloperoxidase (1) é a oxidação do cloreto (Cl^-) a ácido hipocloroso (HOCl) e o $\text{O}_2^{\bullet-}$ é um substrato redutor presente dentro dos fagossomos que influenciam a atividade desta enzima. A mieloperoxidase férrica (MP^{3+}) é convertida em Composto I pelo peróxido de hidrogênio (2) competindo com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ na conversão da enzima em Composto III (3), a oximieloperoxidase, forma da enzima predominante dentro dos fagossomos (WINTERBOURN; GARCIA; SEGAL, 1985). O Composto III também pode ser reduzido pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$ (4), gerando uma rota para o Composto I independente do peróxido de hidrogênio. O $\text{O}_2^{\bullet-}$ também reage com o Composto II da mieloperoxidase (5) impulsionando a reação de cloração e a atividade catalítica da enzima

(KETTLE; WINTERBOURN, 1988), sugerindo-se, desta forma, que este radical também poderia reagir com outros compostos I oxidados, como por exemplo, com a HRP-I (BIELSKI; GEBICKI, 1974).

Espécies reativas produzidas por neutrófilos agem eficientemente contra a maioria das espécies de microrganismos causadores de infecção. Mas no caso de alguns patógenos, como a *P. zopfii*, os neutrófilos não possuem a mesma eficiência, sendo necessária a busca de outras formas para o seu combate.

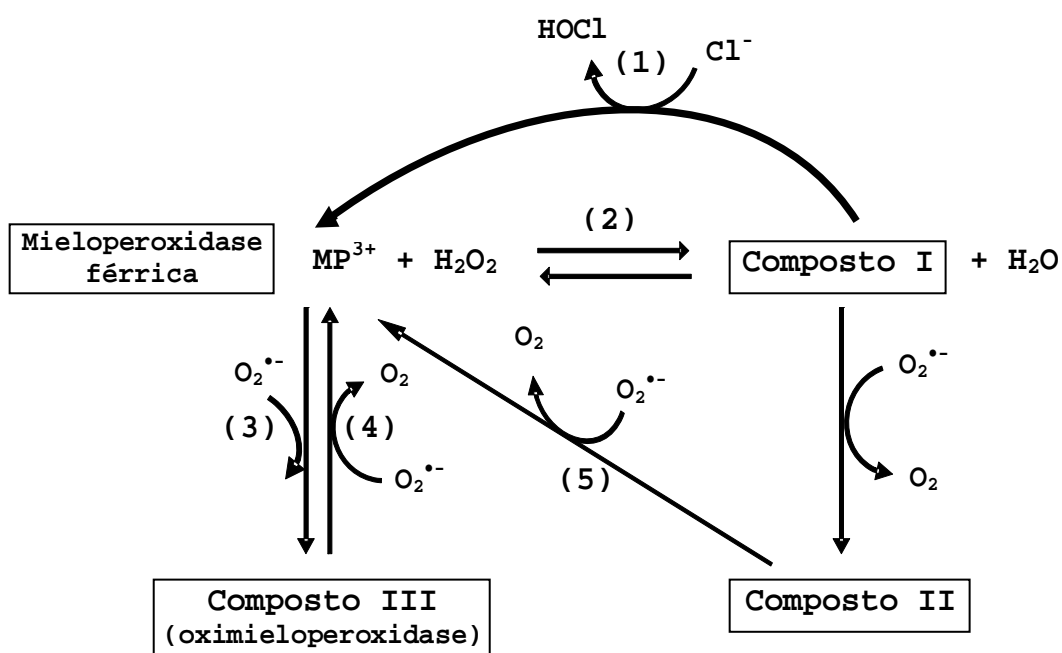


Figura 6 – Reações de oxidação da mieloperoxidase pelo ânion superóxido e outros substratos (KETTLE et al., 2007).

2.6.3 Sistema AIA/HRP

O AIA é um composto de baixa toxicidade que pode ser transformado em um radical citotóxico potente quando oxidado pela peroxidase (FOLKES; WARDMAN, 2001). O sistema AIA/HRP age como um prooxidante avaliado pelo aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (CANDEIAS et al., 1995; CANDEIAS; WARDMAN; MASON, 1997;

ESCOBAR et al., 1992) e pelos efeitos deletérios como indução da peroxidação lipídica e lesões em ácidos nucleicos (FOLKES et al., 1999).

Espécies reativas de oxigênio são formados durante a peroxidação do AIA gerando produtos citotóxicos como os radicais indolil, escatolil, peroxil, como mostrado na Figura 7, superóxido e peróxido de hidrogênio (CANDEIAS et al., 1995; DE MELO et al., 1997), e pode ocasionar efeitos moderadamente tóxicos em neutrófilos e macrófagos (DE MELO et al., 2004).

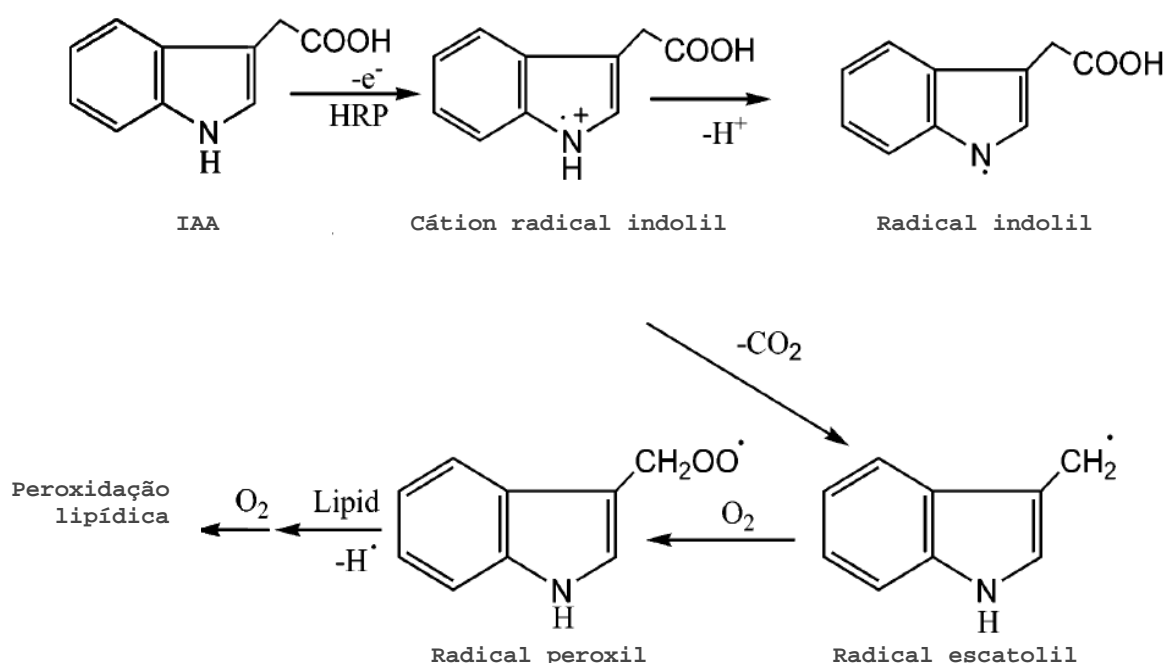


Figura 7 – Formação de radicais reativos da oxidação do AIA pela HRP. Adaptado de Tafazoli e O'brien (2004).

O AIA pode ser oxidado pela HRP por uma via dependente de peróxidos envolvendo o ciclo catalítico da peroxidase (YAMADA; YAMAZAKI, 1974), ou pela HRP na forma ferrosa e HRP-III, independente de hidroperóxidos e requerendo oxigênio, em um processo de autooxidação (METODIEWA; DUNFORD, 1989). Segundo Tafazoli e O'Brien (2004) não somente o radical peroxil gerado da oxidação do AIA pela HRP possui ação citotóxica, mas o produto final da sua oxidação, 3-metileno-2-oxindol (MOI), pode agir em células tumorais (Figura 8).

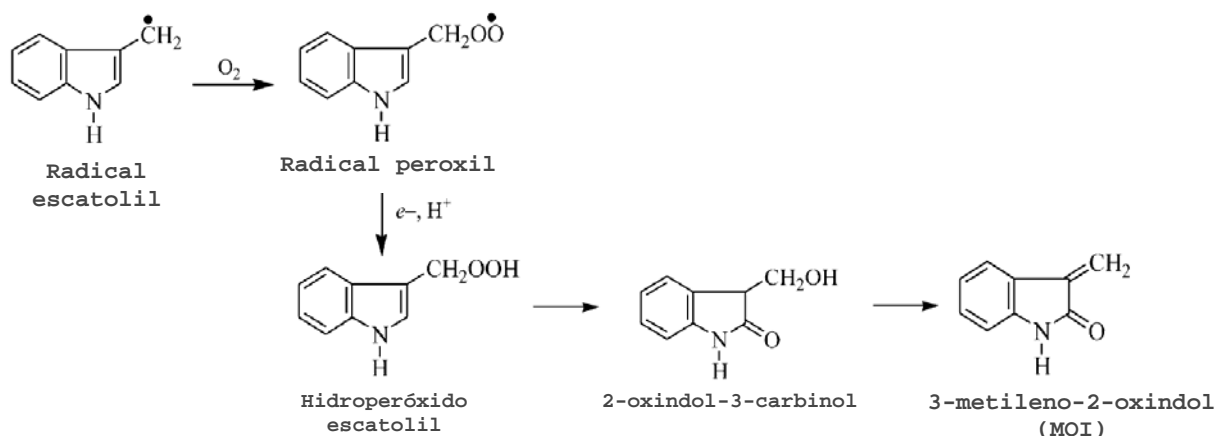


Figura 8 – Redução do radical peroxil a MOI, produto final da oxidação com propriedade citotóxica. Formação de radicais reativos da oxidação do AIA pela HRP. Adaptado de Tafazoli e O'brien (2004).

Vários estudos utilizam o sistema AIA/HRP para verificar o efeito citotóxico das espécies reativas geradas sobre células eucarióticas. Folkes et al. (2002) demonstraram que o sistema AIA/HRP pode ser uma alternativa na terapia contra o câncer com a indução de apoptose em células de melanoma (KIM; JEON; PARK, 2004). De Melo et al. (2004) citaram que o sistema AIA/HRP induz a perda da integridade de membrana, a fragmentação do DNA e a condensação de cromatina em leucócitos, e Folkes e Wardman (2001) relataram que o AIA e o HRP individualmente não produzem nenhum efeito citotóxico sobre células. Com relação aos microrganismos, Pugine (2008) verificou efeito citotóxico do sistema AIA/HRP sobre a viabilidade da *S. aureus* e Cunha et al. (2009) encontraram efeito sobre *P. zoppii*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a alga *P. zopfii* associada à mastite bovina; estudar a interação do microrganismo e neutrófilos recuperados de leite bovino; e avaliar a viabilidade da *P. zopfii* frente ao sistema AIA/HRP em experimentos *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- a) Realizar a caracterização molecular da *P. zopfii* e também avaliar a morfologia celular, morfologia das colônias, curva de crescimento exponencial do microrganismo;
- b) Estudar a interação da *P. zopfii* e neutrófilos recuperados de leite bovino quanto à:
 - Produção de peróxido de hidrogênio pelo neutrófilo;
 - Determinação da atividade específica das enzimas antioxidantes catalase e glutaciona redutase produzidas pelos neutrófilos após serem desafiados pela *P. zopfii*;
 - Determinação da atividade específica das enzimas antioxidantes catalase, glutaciona redutase e superóxido dismutase produzidas pela *P. zopfii*;
 - Capacidade fagocitária analisada pelo englobamento e morte da *P. zopfii* pelo neutrófilo;
 - Contagem das Unidades Formadoras de Colônias da *P. zopfii* após incubação com neutrófilos;
- c) Avaliar a viabilidade da *P. zopfii* frente ao sistema AIA/HRP através da:
 - Contagem de Unidades Formadoras de Colônias;
 - Determinação da atividade específica das enzimas antioxidantes catalase, glutaciona redutase, superóxido dismutase e glutaciona peroxidase;
 - Integridade de membrana por exclusão em azul de Trypan;
 - Integridade do DNA analisada por eletroforese.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e meio de cultura

Os reagentes utilizados nos experimentos são de grau analítico e foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). O meio de cultura ágar *Sabouraud* dextrose foi adquirido da Oxoid (Basingstoke, Hampshire, UK).

4.2 Obtenção do microrganismo

Para a realização de todos os experimentos foi utilizada a alga *P. zopfii* recuperada de casos de mastites clínicas e diagnosticada em vacas criadas em seis rebanhos de fazendas comerciais da região do Sul de Minas Gerais e doada pela Profa. Dra. Andrea Rentz Ribeiro da Pontifícia Universidade Católica (PUC) - Poços de Caldas/MG. A *P. zopfii* foi identificada com base em suas características morfológicas e fisiológicas como tamanho, presença de cápsula e assimilação de açúcares como trealose, dextrose e sucrose, de acordo com Camargo e Fischman (1979) e Pore (1985).

4.3 Cultivo da *P. zopfii*

Nos experimentos foram utilizadas culturas frescas de *P. zopfii*, cultivadas em superfície em meio ágar *Sabouraud* dextrose sólido, meio seletivo adicionado de cloranfenicol 100 mg/L (BUENO; MESQUITA; DIAS FILHO, 2006), a 37°C por 48 horas em aerobiose. Foram coletadas colônias da placa de Petri, lavadas por três vezes em tampão fosfato salina (PBS; concentração final: fosfato 10 mmol/L, NaCl 137 mmol/L, KCl 2,7 mmol/L e pH 7,4) e centrifugadas a 1.507 x *g* por 10 minutos.

Com relação à concentração de células, nos experimentos de funcionalidade de neutrófilos (CUNHA et al., 2006), as células de *P. zopfii* suspensas em solução salina estéril (0,85%) foram ajustadas pela escala de McFarland e incubadas a 37°C.

Para os outros experimentos, o sedimento contendo *P. zopfii* foi ressuspenso em PBS e uma alíquota de 10 µL foi misturada em igual volume do corante azul de Trypan a 0,04% (p/v) diluído em solução salina para a contagem das células em câmara de Neubauer usando microscópio óptico. A diluição final foi ajustada a uma concentração aproximada de $2,0 \times 10^8$ UFC/mL.

4.4 Caracterização da *P. zopfii*

4.4.1 Morfologia celular

Colônias de *P. zopfii* foram ressuspensas em tampão salino fosfato pH 7,4 (PBS) e avaliadas em microscópio óptico e de fluorescência. Em microscópio óptico foram utilizadas alíquotas de 10 µL da suspensão de *P. zopfii* corada 1:1 com azul de Trypan a 0,04% (p/v) diluído em solução salina, as células foram observadas em microscópio óptico (BEL Engineering, Itália) e foram realizados registros das imagens.

Em microscópio de fluorescência foram utilizadas alíquotas de 10 µL da suspensão de *P. zopfii* para avaliar a fluorescência natural da alga na região do azul, verde e vermelho através de microscópio de fluorescência (Axioplan 2, Zeiss, Alemanha). A fluorescência azul foi detectada a 420 nm, a verde a 515 nm e a vermelha a 590 nm, com excitação a 365 nm, 450 nm e 546 nm respectivamente. Foram realizados registros das imagens.

4.4.2 Morfologia das colônias

Para observação das características morfológicas das colônias da *P. zopfii*, a alga foi semeada em superfície em placas de Petri contendo ágar *Sabouraud* dextrose sólido e as placas foram incubadas à temperatura de 37°C em condições de aerobiose durante 48 horas.

4.4.3 Curva de crescimento exponencial em ágar *Sabouraud* dextrose e PBS

O crescimento exponencial da *P. zopfii* foi acompanhado em ágar *Sabouraud* dextrose e em tampão salino fosfato pH 7,4 durante 25 dias. A cada período de tempo, um número de células viáveis foi contado na câmara de Neubauer usando um microscópio óptico (Nikkon, Japan) e corante azul de Trypan a 0,04% (p/v) diluído em solução salina. A porcentagem de viabilidade celular foi determinada pela contagem do número de células viáveis (não coradas) e células mortas (coradas).

4.4.4 Caracterização molecular

4.4.4.1 Extração do DNA

O DNA da *P. zopfii* foi extraído utilizando-se o kit de extração *Wizard[®] Genomic DNA Purification* (Promega, USA), seguindo as instruções do fabricante, com pequenas modificações. O sedimento da *P. zopfii* foi macerado em almofariz de porcelana com nitrogênio líquido e 180 mg do pó formado foi transferido para um microtubo para extração do DNA. Foram adicionados 600 µL de solução de lise nucléica e a amostra foi incubada a 65°C por 15 minutos. Em seguida foram adicionados 3 µL da solução de RNase, incubado a 37°C por 15 minutos. A amostra permaneceu em temperatura ambiente por 5 minutos.

Para a precipitação da proteína, foram adicionados 200 µL da solução de precipitação, a amostra foi centrifugada a 9.447 x *g* por 3 minutos e o sobrenadante transferido para um novo microtubo contendo 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente. A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 9.447 x *g* por 1 minuto. Nesta etapa o sobrenadante foi descartado e 600 µL de etanol a 70% foram adicionados. Após centrifugação a 9.447 x *g* por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e após evaporação total do etanol, foram adicionados 100 µL de solução de re-hidratação do DNA e a amostra foi incubada a 65°C por uma hora. Ao final da extração, a amostra foi congelada para posterior quantificação e análises.

A dosagem e a avaliação do grau de pureza das amostras de DNA foi realizada através de espectrofotometria em um aparelho *BioPhotometer[®]* (Eppendorf, Alemanha), sendo o grau de pureza determinado pela relação da absorbância a 260/280 nm. A amostra contendo o DNA foi diluída para se obter a concentração de 100 ng/µL.

4.4.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) específica para genotipagem da *P. zopfii*

A caracterização molecular da *P. zopfii* foi baseada na análise da sequência do gene da subunidade 18S do DNA ribossomal e investigada através da amplificação via PCR específicas para os biotipos 1, 2 e 3, e uma amplificação de controle interno, conforme descritos por Roesler et. (2006), Möller et al. 2007) e Osumi et al. (2008). Para a PCR foram utilizados oligonucleotídeos delineados segundo Roesler et al. (2006) e são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Primers utilizados no estudo.

Primer	Descrição	Sequência
Proto18-4f*	<i>Foward</i> do Controle Interno e dos Genótipos 1 e 2	5'-GACATGGCGAGGATTGACAGA-3'
Proto18-4r*	<i>Reverse</i> do Controle Interno	5'-AGCACACCCAATCGGTAGGA-3'
PZ GT 1/r	<i>Reverse</i> do Genótipo 1	5'-GCCAAGGCCCCCGAAG-3'
PZ GT 2/r	<i>Reverse</i> do Genótipo 2	5'-GTCGGCGGGGCAAAGC-3'
PZGT 3-IK/f	<i>Foward</i> do Genótipo 3	5'-CAGGGTTCGATTCCGGAGAG-3'
PZGT 3/r	<i>Reverse</i> do Genótipo 3	5'-GTTGGCCCGGCATCGCT-3'

*f = *Foward* e r = *Reverse*.

O DNA genômico da *P. zopfi* foi amplificado em uma mistura de reação contendo tampão da Taq (1x), MgCl₂ 3,0 mmol/L, dNTPs 0,2 mmol/L e Taq polimerase 1.0 U (Invitrogen), DNA 100 ng/μL e 0,5 μM de cada par de primer (*Reverse* e *Foward*) em 25 μL de reação. A amplificação foi realizada em 35 ciclos, sendo a desnaturação a 94°C por 30 segundos, o anelamento a 58°C por 30 segundos e a polimerização a 72°C por 40 segundos em termociclador (Eppendorf, USA).

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) e corados com brometo de etídio, utilizando como padrão 100 pb DNA Ladder (100-2.000 pb; Invitrogen, USA), um marcador de pares de base.

4.5 Interação da *P. zopfi* e neutrófilos recuperados de leite bovino

4.5.1 Animais

Para recuperação de neutrófilos bovinos, foram utilizadas três vacas Holandesas em lactação do rebanho da Escola Agrotécnica Federal de Machado, Minas Gerais (Figura 9).

A dieta fornecida aos animais foi basicamente uma mistura de silagem de milho, concentrado e minerais de acordo com a recomendação da *National Research Council* (NRC, 2001) para vacas em lactação.



Figura 9 – Colheita de leite.

4.5.2 Obtenção dos neutrófilos

O leite foi colhido em tubos estéreis, transportado em caixa de isopor com gelo (Figura 10) e levado ao Laboratório de Química Biológica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP.



Figura 10 – Transporte das amostras de leite em caixas de isopor com gelo.

As amostras de leite foram colhidas assepticamente de todos os quartos mamários de vacas com resultado negativo para o teste CMT (*California Mastitis Test* - SCHALM; NOOLANDER, 1957; Figura 11) e acondicionadas em tubos estéreis. Antes da colheita do leite, a leucocitose foi estimulada com uma infusão intramamária de 40 mL de solução de glicogênio de ostra a 0,1 e 0,5% por 36 e 12 horas respectivamente (VALLE, 2005; WEBER; PETERHANS; WYLER, 1983). No laboratório o leite foi centrifugado a 447 x *g* por 10 minutos, o sobrenadante desprezado e as células sedimentadas (a maioria neutrófilos por serem as primeiras células a chegarem ao sítio de combate contra um corpo estranho) lavadas três vezes em PBS estéril, e mantidas em seguida no gelo (GRASSO et al., 1990).

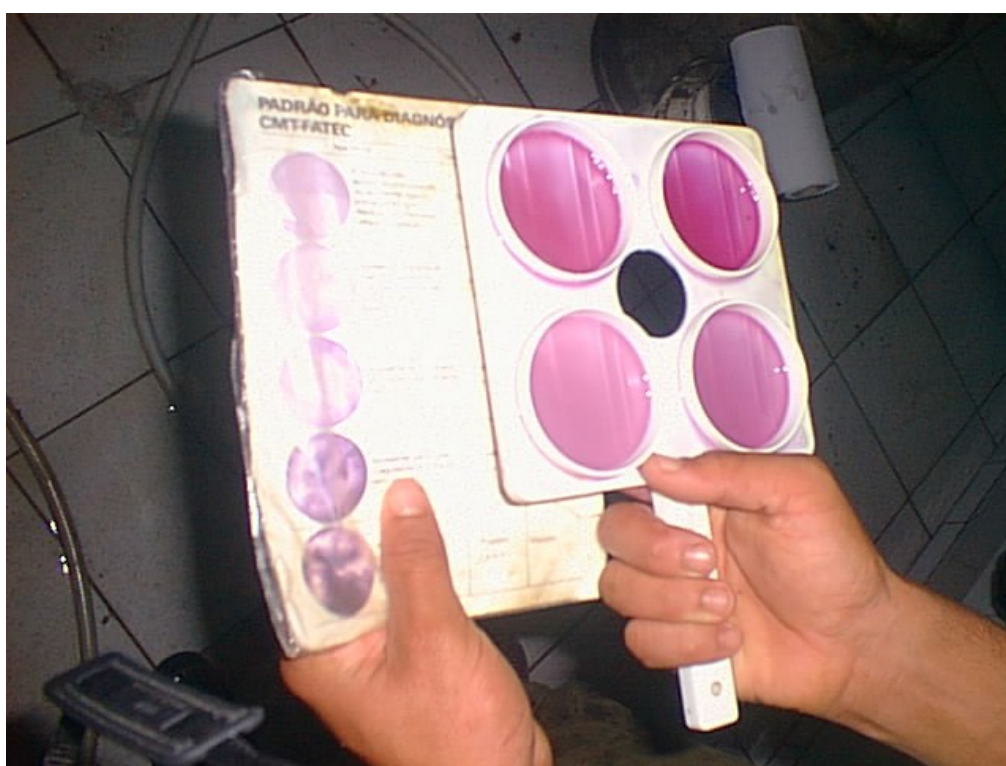


Figura 11 – *California Mastitis Test*. teste subjetivo de campo para diagnóstico de mastite.

Para avaliar a viabilidade, os neutrófilos foram diluídos em PBS estéril, misturados em igual volume de azul de Trypan a 0,04% diluído em solução salina e contados por exclusão no microscópio óptico utilizando a câmara de Neubauer, sendo consideradas mortas as que ficaram azuis, como ilustra a Figura 12 (ABSOLOM, 1986; VALLE, 2005).

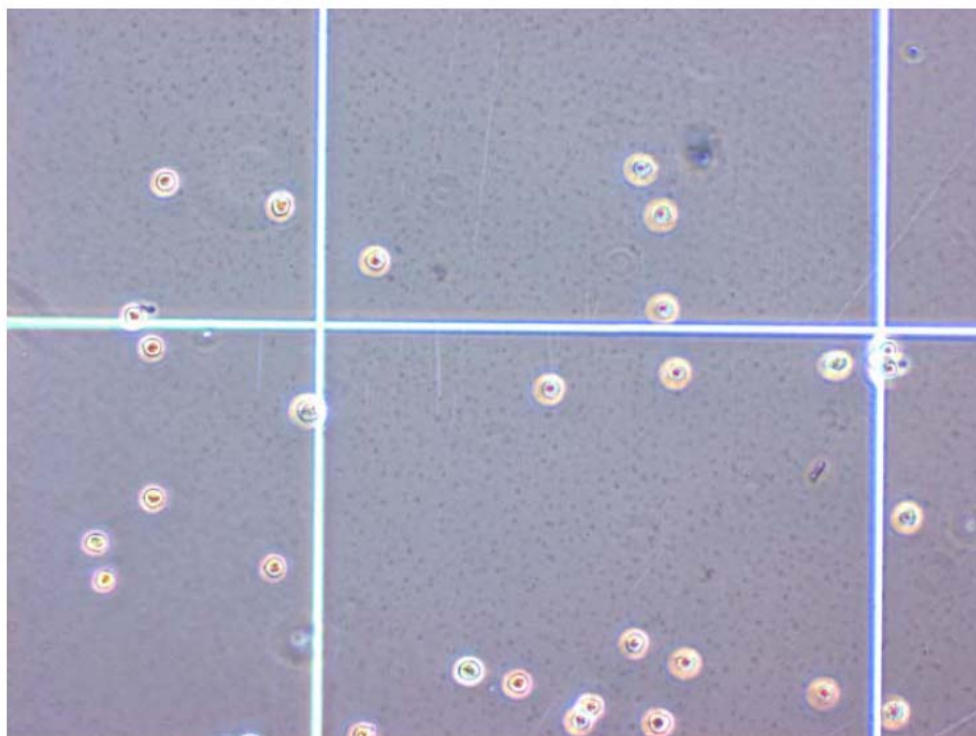


Figura 12 - Viabilidade de neutrófilos através da contagem em câmara de Neubauer no microscópio óptico (400x). Células azuis coradas pelo azul de Trypan foram consideradas mortas (VALLE, 2005).

4.5.3 Opsonização da *P. zopfii*

A *P. zopfii* foi cultivada em meio ágar *Sabouraud* dextrose sólido a 37°C por 48 horas em aerobiose, colônias foram coletadas, lavadas e ressuspensas em tampão salino fosfato pH 7,4 (PBS). Para opsonização, 0,5 mL da suspensão contendo os microrganismos ($2,4 \times 10^9$ células/mL em PBS) foram incubados por 20 minutos a 37°C com 0,5 mL de soro bovino (pré-aquecido a 56°C durante 30 minutos). Os microrganismos opsonizados foram conservados a -20°C por um período máximo de 15 dias (ABSOLOM, 1986).

4.5.4 Ensaio de fagocitose

Neutrófilos recuperados e diluídos na concentração de $2,0 \times 10^7$ células/mL foram incubados na ausência e na presença de *P. zopfii* opsonizada ($2,0 \times 10^8$ células/mL) por 45

minutos a 37°C em PBS suplementado com 2% de soro albumina livre de ácidos graxos e glicose 5 mmol/L.

Em seguida, a suspensão do ensaio foi lavada três vezes em PBS e centrifugada a 447 x *g* por 10 minutos para sedimentação dos neutrófilos. Após a centrifugação, o sobrenadante com os microrganismos foi separado, e os neutrófilos ressuspensos em PBS foram congelados a -176°C.

4.5.5 Produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos

A produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos foi avaliada pelo método de vermelho de fenol (PICK & MIZEL, 1981). Neutrófilos ($2,0 \times 10^7$ células/mL) foram incubados em meio contendo glicose 5 mmol/L e uma solução de vermelho de fenol (0,1%) e peroxidase a 37°C por 45 minutos na ausência e presença da *P. zopfii* opsonizada ($2,0 \times 10^8$ células/mL). Após incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 µL de NaOH 1N e a quantidade de produto formado foi avaliada pelo espectrofotômetro a 620 nm (Hitachi, U-2810, USA).

Este método é baseado na conversão de vermelho de fenol, pela ação de peroxidase e H₂O₂ produzido pelas células, em um composto colorido e quantificado no espectrofotômetro a 620 nm após 45 minutos de ensaio.

4.5.6 Atividade específica de enzimas antioxidantes produzidas pelos neutrófilos

4.5.6.1 Extração das enzimas

Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes as amostras foram retiradas do Nitrogênio líquido, descongeladas, centrifugadas por 10 minutos a 9.447 x *g*, o sobrenadante descartado e os sedimentos homogeneizados vigorosamente em 500 µL de meio de extração contendo tampão fosfato de sódio 10 mmol/L pH 7,4 para as posteriores análises.

4.5.6.2 Atividade específica da catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada espectrofotometricamente (DU-800, Beckman, USA) pelo consumo de peróxido de hidrogênio a 240 nm e 25°C (BEERS; SIZER, 1952). O meio reacional continha tampão fosfato de potássio 50 mmol/L pH 7,0 e peróxido de hidrogênio 10 mmol/L. A reação foi iniciada pela adição da amostra e acompanhada durante 3 minutos. A reação química ocorrida nesta metodologia correspondeu à equação:



A atividade específica da CAT foi expressa em μmol de H_2O_2 consumido por minuto por miligrama de proteína.

4.5.6.3 Atividade específica da glutatona redutase (GR)

A atividade da glutatona redutase foi determinada espectrofotometricamente (DU-800, Beckman, USA) com base no decréscimo da concentração de NADPH com a concomitante redução da glutatona oxidada (GSSG) a 340 nm e 25°C (CARLBERG; MANNERVIK, 1985). O meio reacional continha tampão fosfato de potássio 100 mmol/L pH 7,0, EDTA 1 mmol/L, NADPH 0,1 mmol/L, GSSG 1 mmol/L. A reação foi iniciada pela adição da amostra e acompanhada durante 3 minutos. A reação química correspondente a esta metodologia foi a conversão da glutatona oxidada (GSSG) em glutatona reduzida (GSH). A atividade específica da GR foi expressa em nmol de NADPH oxidado por minuto por miligrama de proteína.

4.5.6.4 Determinação de proteínas totais

O conteúdo de proteínas das amostras foi determinado espectrofotometricamente (DU-800, Beckman, USA) pelo método descrito por Bradford (1976), usando soro albumina bovino para construção da curva padrão (BRADFORD, 1976).

4.5.7 Atividade específica das enzimas antioxidantes produzidas pela *P. zopfii*

A *P. zopfii* foi opsonizada conforme o protocolo descrito no item 4.5.3, diluída e obtida a concentração aproximada de $2,4 \times 10^8$ células/mL utilizando-se a contagem de células

pela câmara de Neubauer. As *P. zoppii* e neutrófilos ($2,0 \times 10^7$ células/mL) foram primeiramente incubados em placas de plástico por uma hora sob agitação e à temperatura de 37°C. Após o tempo decorrido, as alíquotas das placas de ensaio foram transferidas para placas de vidro por 20 minutos, em repouso, para aderência dos neutrófilos. Foram feitos esfregaços das alíquotas antes e depois da transferência para placas de vidro para visualização.

Após a separação dos dois tipos celulares devido à aderência dos neutrófilos, as alíquotas de todas as placas contendo apenas os microrganismos foram transferidas para seus respectivos microtubos, centrifugados por 10 minutos a $9.447 \times g$.

4.5.7.1 Extração das enzimas

Para extração das enzimas da *P. zoppii*, os sedimentos foram homogeneizados vigorosamente em 500 µL de meio de extração contendo tampão sódio fosfato 10 mmol/L pH 7,4 para as posteriores análises.

4.5.7.2 Atividade específica da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada espectrofotometricamente de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.6.2.

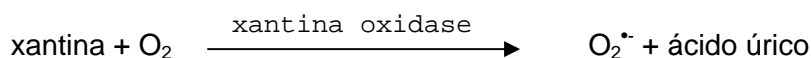
4.5.7.3 Atividade específica da glutatona redutase (GR)

A atividade da glutatona redutase foi determinada espectrofotometricamente de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.6.3.

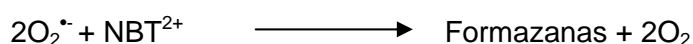
4.5.7.4 Atividade específica da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi determinada espectrofotometricamente (DU-800, Beckman, USA) de acordo com a taxa de redução do *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) pelo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a 550 nm e 25°C, acompanhada por 3 minutos (BEUCHAMP;

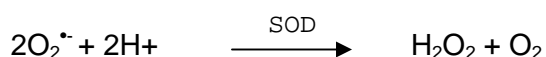
FRIDOVICH, 1971). Nesta metodologia, o sistema xantina-xantina oxidase é utilizado como fonte geradora de ânion superóxido, de acordo com a equação:



O ânion superóxido gerado por este sistema reduz o NBT transformando-o em formazana (composto azul insolúvel indicadora da presença do $\text{O}_2^{\bullet -}$), conforme a equação:



Se a SOD estiver presente na amostra competirá pelo ânion superóxido inibindo a taxa de redução do NBT, ocorrendo a reação:



O meio reacional continha tampão fosfato de sódio 53 mmol/L pH 7,8, NBT 0,1 mmol/L, xantina 0,05 mmol/L, xantina oxidase 0,013 UI/L e EDTA 0,1 mmol/L. Neste ensaio, o primeiro passo foi adequar a quantidade de xantina oxidase necessária para que a redução do NBT pelo $\text{O}_2^{\bullet -}$ fosse igual a 0,030 unidade de absorbância por minuto na ausência da amostra (SOD). O segundo passo foi adequar a diluição da amostra para que a redução do NBT pelo $\text{O}_2^{\bullet -}$ fosse inibida pela SOD em um valor correspondente entre 20 e 40%. A diluição da amostra foi realizada em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4.

Os cálculos da atividade da SOD foram realizados com base na definição: uma unidade de enzima corresponde a 50% de inibição da taxa de redução do NBT (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004) A atividade específica da SOD foi expressa em μmol por minuto por miligrama de proteína.

4.5.7.5 Determinação de proteínas totais

O conteúdo de proteínas das amostras foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.6.4.

4.5.8 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias da *P. zopfii* após incubação com neutrófilos

A morte da *P. zopfii* determinada pela Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi realizada no tempo zero e após fagocitose. Assim, células foram ressuspensas em água destilada estéril, vortexadas vigorosamente por 5 minutos para lise dos neutrófilos e posteriormente diluídas em PBS estéril. O número de colônias de microrganismos viáveis foi determinado pelo plaqueamento em superfície das amostras em ágar *Sabouraud* dextrose e incubado a 37°C por 48 horas em aerobiose.

4.5.9 Capacidade fagocitária

A capacidade fagocitária avaliada pelo englobamento e morte da *P. zopfii* pelos neutrófilos foi mensurada pela visualização deste microrganismo usando um microscópio de fluorescência (Zeiss, Axioplan 2, Alemanha). Neutrófilos na diluição de $2,0 \times 10^6$ células/mL foram incubados por 45 minutos a 37°C em PBS suplementado com 2% de soro albumina livre de ácidos graxos e glicose 5 mmol/L, na ausência e presença de *P. zopfii* opsonizada ($2,0 \times 10^7$ células/mL). Após a incubação, a suspensão contendo neutrófilos e microrganismos foi colocada em gelo por 10 minutos para interromper a fagocitose e em seguida, centrifugada a $447 \times g$ por 5 minutos. O sedimento foi usado para posterior análise.

O englobamento e morte dos microrganismos avaliados pelo microscópio de fluorescência foram determinados por ensaios utilizando o fluorocromo Laranja de acridina ou *Acridine Orange* (AO) como descrito por Absolom (1986). Células viáveis e microrganismos vivos apresentam-se com fluorescência verde (DNA intacto), enquanto células mortas apresentam fluorescência avermelhada (DNA denaturado).

Desta forma, após o processo de fagocitose, o sedimento contendo neutrófilos foi ressuspendido em 200 µL do corante AO. O corante foi preparado usando 1 mL de AO estoque (0,1%; m/v) juntamente com 4,0 mL de ácido cítrico 0,1 M e 250 µL de fosfato disódico 0,3 M. As lâminas foram preparadas com 10 µL da solução corada e observadas no microscópio de fluorescência (Axioplan 2, Zeiss, Alemanha) em aproximadamente 50 neutrófilos por cada lâmina.

4.5.10 Processamento de imagem

A interação entre neutrófilos e *P. zopfii* foi avaliada usando a técnica de processamento de imagens Matlab® (v5, Mathworks, Natick, MA). O software de processamento de imagens com suas ferramentas foram usados para detectar microestruturas no interior do objetivo mostrando a partir da imagem original outra imagem que é conhecida como imagem segmentada. O método de segmentação consiste dos seguintes passos: encontrar todas as pequenas estruturas na imagem, ampliar em um objeto maior na imagem e extrair elementos comuns em ambas as imagens (RUSS, 1998).

4.6 Viabilidade da *P. zopfii* frente ao sistema AIA/HRP

4.6.1 Obtenção e cultivo da *P. zopfii*

Para a realização dos experimentos de incubação da *P. zopfii* com o sistema AIA/HRP, a obtenção e cultivo do microrganismo seguiu o mesmo protocolo descrito nos itens 4.2 e 4.3.

4.6.2 Preparo do AIA e HRP

A solução estoque de AIA 10 mmol/L foi preparada a partir de 0,1752 g de AIA em 80 mL de PBS sob agitação constante e, em seguida, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) 5 N até a completa dissolução (pH em torno de 12). O pH, então, foi corrigido para 7,4 usando ácido clorídrico (HCl) 25% (v/v). O volume foi completado para 100 mL com PBS. A solução estoque de HRP 10 µmol/L utilizada nos experimentos foi preparada a partir de uma solução 570 µmol/L, misturando-se 17,5 µL de HRP 570 µmol/L com 982,5 µL de PBS.

4.6.3 Incubação da *P. zopfii* com o sistema AIA/HRP

A partir da amostra contendo *P. zopfii* na concentração de $2,0 \times 10^8$ UFC/mL, conforme descrito no item 4.3, foi obtida a concentração de $2,0 \times 10^4$ UFC/mL para a determinação das unidades formadoras de colônias e avaliação da integridade de membrana. Para a determinação da integridade do DNA e atividade das enzimas

antioxidantes a concentração utilizada de *P. zopfii* foi de $2,0 \times 10^7$ UFC/mL. Estas diluições foram utilizadas para incubação da *P. zopfii* na ausência (controle) e presença do sistema AIA (1 mmol/L)/HRP(1 μ mol/L) em diferentes tempos (0, 3, 6, 9 e 12 horas) a 37°C sob agitação lenta e constante. Utilizou-se PBS como meio de incubação e foram realizados ensaios contendo somente microrganismo/AIA ou microrganismo/HRP.

4.6.4 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)

Após os diferentes tempos de incubação, 100 μ L da amostra de todos os ensaios (descritos no item 4.6.3) contendo *P. zopfii* ($2,0 \times 10^4$ UFC/mL) foi plaqueada em ágar *Sabouraud* dextrose. As placas foram mantidas em aerobiose por 48 horas a 37°C. O número de colônias foi determinado utilizando-se um contador de colônias e os resultados foram expressos em UFC por mililitro. A viabilidade da *P. zopfii* foi determinada pela contagem das unidades formadoras de colônias e foi realizado o registro fotográfico das placas em câmara digital (SONY®, Modelo N° DSC-P41).

4.6.5 Atividade específica de enzimas antioxidantes da *P. zopfii*

4.6.5.1 Preparo das amostras

Após os diferentes tempos de incubação as amostras da *P. zopfii* ($2,0 \times 10^8$ UFC/mL) incubadas como descrito no item 4.6.3, foram centrifugadas por 10 minutos a $9.447 \times g$, o sobrenadante descartado e o sedimento congelado em nitrogênio líquido para posterior extração e determinação da atividade específica das enzimas.

4.6.5.2 Extração das enzimas

Para a extração das enzimas antioxidantes o sedimento obtido anteriormente e congelado, foi macerado com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. A amostra foi diluída em PBS, centrifugada por 10 minutos a $9.447 \times g$ e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade das enzimas e conteúdo de proteínas totais.

4.6.5.3 Atividade específica da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada espectrofotometricamente de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.6.2.

4.6.5.4 Atividade específica da glutathiona redutase (GR)

A atividade da glutathiona redutase foi determinada espectrofotometricamente de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.6.3.

4.6.5.5 Atividade específica da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.7.4.

4.6.5.6 Atividade específica da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada espectrofotometricamente (DU-800, Beckman, USA) com base no decréscimo da concentração de NADPH a 340 nm e 37°C (PAGLIA; VALENTINE, 1967).

O meio reacional continha tampão fosfato de potássio 100 mmol/L pH 7,0, EDTA 3,0 mmol/L, NADPH 0,1 mmol/L, Glutathiona Reduzida (GSH) 2,0 mmol/L, GR 2,6 UI/mL, azida de sódio (1 mmol/L) e cumene hidroperóxido 1,3 mmol/L. A reação foi iniciada pela adição de cumene hidroperóxido utilizado como substrato e acompanhada durante 3 minutos.

A reação química correspondente a esta metodologia foi a redução do cumene a álcool gerando Glutathiona Oxidada (GSSG) a partir da Glutathiona Reduzida (GSH). A atividade específica da GPx foi expressa em μmol de NADPH oxidado por minuto por miligrama de proteína.

4.6.5.7 Determinação de proteínas totais

O conteúdo de proteínas das amostras foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o protocolo descrito no item 4.5.6.4.

4.6.6 Integridade de membrana da *P. zopfii* por exclusão em azul de Trypan

Para avaliar a integridade de membrana celular após incubação da *P. zopfii* com o sistema AIA/HRP, os microrganismos foram corados com corante azul de Trypan a 0,04% (p/v) diluído em solução salina. O número de células viáveis (não-coradas) foi contado através da câmara de Neubauer utilizando um microscópio óptico (Nikkon, Japão) e os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis.

4.6.7 Integridade do DNA da *P. zopfii*

4.6.7.1 Preparo das amostras

Após os diferentes tempos de incubação, as amostras da *P. zopfii* ($2,0 \times 10^8$ UFC/mL) incubadas conforme descrito no item 4.6.3, foram centrifugadas por 10 minutos a $9.447 \times g$, o sobrenadante descartado e o sedimento congelado a -20°C para posterior extração e análise da integridade do DNA.

4.6.7.2 Extração de DNA

Para a lise da *P. zopfii*, o sedimento obtido anteriormente e congelado, foi macerado com nitrogênio líquido em almofariz de porcelana. A extração do DNA foi realizada utilizando o kit (Wizard[®] Genomic DNA Purification) seguindo as instruções do fabricante.

A concentração de DNA foi calculada utilizando-se BioPhotometer[®] (Eppendorf, Alemanha) através da razão das absorbâncias avaliadas em 260 nm e em 280 nm. A amostra contendo o DNA foi diluída para obter a concentração de 200 ng/ μL , como recomendado pelo método.

4.6.7.3 Corrida eletroforética em gel de poliacrilamida

O DNA extraído e quantificado foi submetido à eletroforese vertical em gel de poliacrilamina 10% a 100 Volts por 90 minutos e corado com nitrato de prata 0,2% (p/v) (BASSAM; CAETANO-ANOLLÉS; GRESSHOFF, 1991).

4.7 Expressão dos resultados e análises estatísticas

Para todos os resultados obtidos neste trabalho, a comparação entre grupos foi realizada utilizando-se análises de variância (ANOVA), com nível de significância de 5% de probabilidade. Para as diferenças significativas foram aplicadas comparações entre médias usando o teste Tukey, através do programa MINITAB[®]. Os dados foram expressos em média e desvio padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da *P. zopfii*

5.1.1 Morfologia celular

Em uma visualização microscópica de esfregaço de *P. zopfii* observado a fresco (BRITO; VEIGA, 1997), as células se apresentam de diversos tamanhos celulares que indicam as diferentes fases do crescimento microbiano (Figura 13), e ainda a presença de inúmeras células-mãe, denominadas esporângios, formando por divisão interna, células-filhas, denominadas esporangiósporos ou endósporos. No processo de reprodução assexuada, os esporangiósporos permanecem dentro do esporângio, envoltos por uma cápsula trilaminar de esporopolenina, até sua liberação no meio ambiente (PORE, 1985).

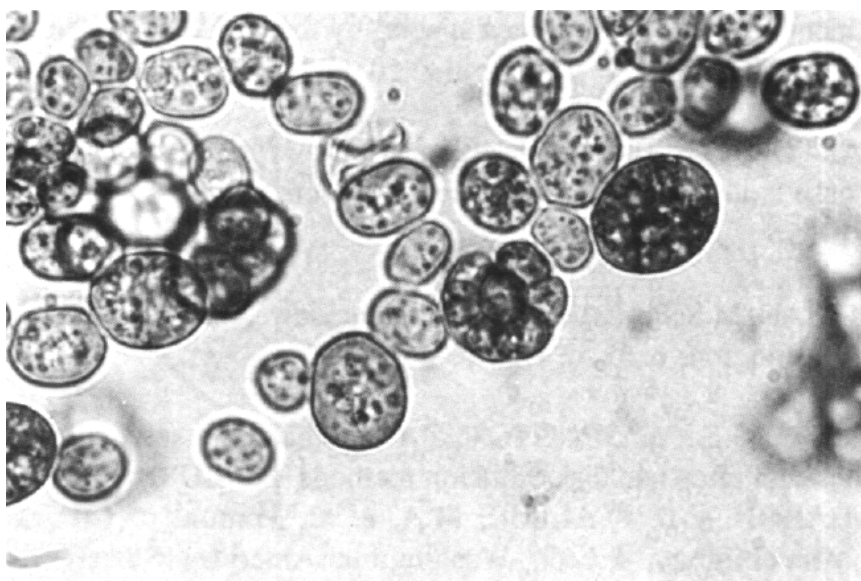


Figura 13 - Esfregaço preparado a fresco corado com azul de metileno (BRITO; VEIGA, 1997), mostrando os diversos tamanhos celulares de *P. zopfii* e células se dividindo internamente com formação de endósporos (1000x).

A identificação macroscópica e a observação de colônias da *P. zopfii* em laboratório (BEXIGA et al., 2003) é realizada pelo cultivo microbiológico em placas de Petri através de

meios nutritivos sólidos que podem ser de dois tipos: um não-seletivo (ágar sangue desfibrinado 5%) ou seletivo (ágar *Sabouraud* dextrose). Microscopicamente, os estudos de crescimento microbiano são feitos essencialmente em meios líquidos. Para que ocorram as divisões celulares, os microrganismos necessitam de um ambiente propício com todos os constituintes químicos e físicos necessários para o seu metabolismo. A estimativa da concentração de células da suspensão em crescimento pode ser obtida através da contagem ao microscópio, utilizando-se a Câmara de Neubauer, também conhecida como Câmara de Contagem de Petroff-Hausser (PELCZAR et al., 1980).

Neste trabalho foram observadas células de *P. zopfii* em microscopia de fluorescência e foi verificada a presença do fenômeno de autofluorescência neste microrganismo. Na Figura 14 observam-se células sem o uso dos filtros de excitação e de barragem (A), e com o uso dos filtros em três diferentes comprimentos de onda fluorescendo nas cores vermelho (B), verde (C) e azul (D).

Fluorescência é um fenômeno pelo qual uma substância absorve luz de certo comprimento de onda com energia suficiente para promover a excitação eletrônica, o retorno dos elétrons a um nível menos energético causa a emissão de luz (fluorescência) em comprimento de onda maior que aquele da luz absorvida. A fluorescência, ao contrário da fosforescência, se dá somente durante a irradiação, ou seja, enquanto houver a absorção de luz, e algumas substâncias absorvem energia da radiação ultravioleta (UV), fluorescendo dentro do espectro de luz visível (TABOGA, 2001). Muitas células contêm moléculas que se tornam fluorescentes quando excitadas por radiação UV/Visível, e pelo comprimento de onda essa emissão de fluorescência decorrente de fluoróforos endógenos se torna uma propriedade intrínseca da célula denominada de autofluorescência (MONICI, 2005).

Na microscopia de fluorescência podem-se detectar compostos naturalmente fluorescentes, como a clorofila, lignina de paredes celulares, elastina e colágeno (TABOGA, 2001); e também compostos exógenos (os corantes) adicionados ao ensaio que possuem características fluorescentes individualmente ou combinados com moléculas presentes nas células como proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, dentre outros (GOLIM et al., 2007). Moléculas fluorescentes tem se tornado uma importante ferramenta de pesquisa para localização, identificação e isolamento de alvos biológicos específicos como proteínas, ácidos nucleicos, componentes celulares e inclusive células inteiras, e assim se obter informações sobre o estado morfológico e fisiológico de células e tecidos (MONICI, 2005).

No presente estudo foi registrado, pela primeira vez, o fenômeno de autofluorescência da *P. zopfii* nos comprimentos de ondas estudados, mas ainda é necessário realizar estudos para identificação dos compostos fluorescentes presentes nessa alga e compreender melhor este fenômeno.

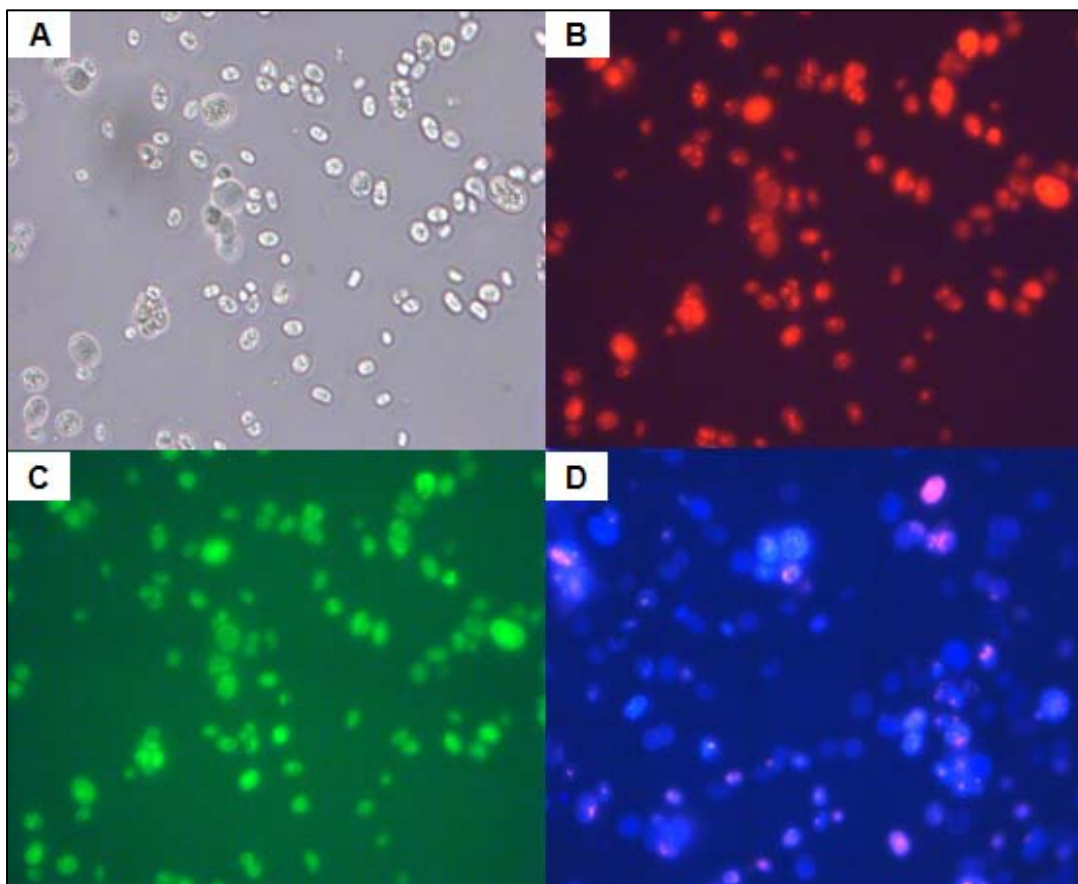


Figura 14 - Visualização da *P. zopfii* em microscópio de fluorescência: (A) Sem uso dos filtros de excitação e de barragem, (B) Com uso dos filtros, excitação a 450 nm e emissão 515 nm, (C) Com uso dos filtros, excitação a 546 nm e emissão 590 nm, e (D) Com uso dos filtros, excitação a 365 nm e emissão 420 nm (Zeiss, Axioplan 2, Alemanha, 400x).

5.1.2 Morfologia das colônias

Neste experimento, a incubação das placas semeadas foi realizada em meio ágar *Sabouraud* dextrose à temperatura de 37°C, em condições de aerobiose e durante 48 a 96 horas. Geralmente, as colônias de *P. zopfii* (Figura 15) apresentam um diâmetro variável entre 3 e 6 mm, coloração branca, aspecto plano com protrusão central, bordas irregulares e superfície granular (BEXIGA et al., 2003).

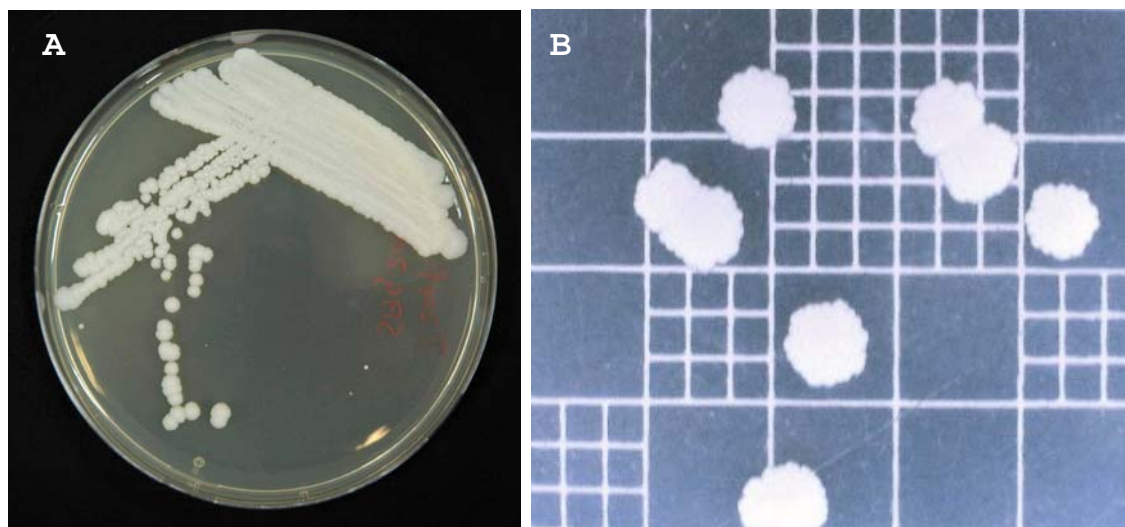


Figura 15 - Observação macroscópica de colônias de *P. zopfii* crescidas por esgotamento em ágar *Sabouraud* dextrose (A) e visualização das colônias de *P. zopfii* em contador de colônias (B).

5.1.3 Curva de crescimento exponencial em ágar *Sabouraud* dextrose e em PBS

Os dados do crescimento exponencial da *P. zopfii* encontram-se na Figura 16. Observou-se que o microrganismo cultivado em PBS apresentou um crescimento exponencial máximo no tempo de 24 horas de incubação entrando, em seguida, em uma fase de morte, provavelmente devido à escassez de nutrientes disponíveis no meio e ao aumento de produtos tóxicos provenientes do próprio metabolismo celular.

Segundo Pelczar et al. (1980) a medida quantitativa do crescimento microbiano é significativa para a interpretação de várias respostas fisiológicas e a determinação do número de células por microscopia direta é um método de contagem rápida e simples e possui a vantagem de permitir que seja observada, simultaneamente, a morfologia celular.

Em meio ágar, a *P. zopfii* apresentou um crescimento exponencial ao longo de todo o tempo de incubação (138 horas) e não foi possível determinar o início da fase de morte deste microrganismo. Este comportamento pode explicar a extensão da viabilidade e a capacidade deste patógeno em resistir e sobreviver em locais úmidos e em áreas com acúmulo de lama e fezes (COSTA et al., 1996c).

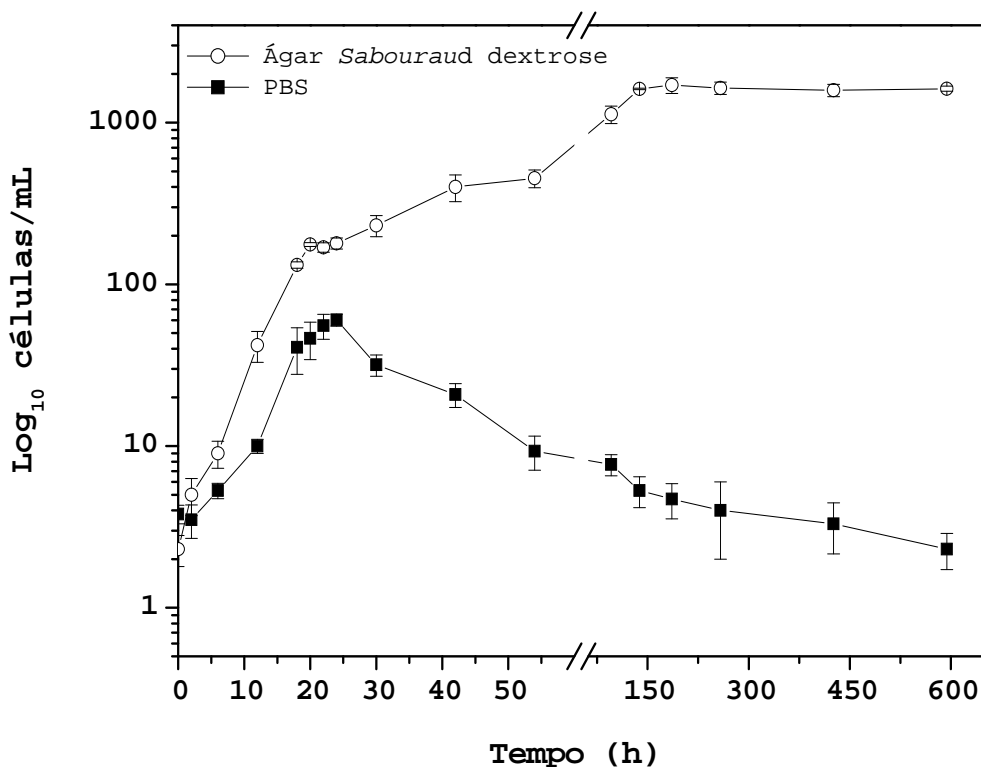


Figura 16 - Curva de crescimento exponencial (Log_{10} células/mL) da *P. zopfii* cultivada em meio ágar *Sabouraud* dextrose e em PBS avaliada em função do tempo.

5.1.4 Caracterização molecular da *P. zopfii*

Neste estudo, foram feitas ampliações da sequência do gene da subunidade 18S do DNA ribossomal da *P. zopfii* através da PCR usando primers específicos para os biotipos 1, 2 e 3, e um primer de amplificação interna que serviu como controle. O gel da genotipagem da *P. zopfii* pode ser observado na Figura 17. Como produtos de PCR foram obtidos fragmentos de DNA para os genótipos 1 (150 pb), 2 (165 pb) e 3 (125 pb), e o fragmento de amplificação interna com 450 pb.

Baseado na análise da sequência do gene 18S rRNA usando PCRs específicos para os biotipos 1, 2 e 3, Möller et al. (2007) relataram que os três genótipos depositados no *Stammsammlung für Algenkulturen* (SAG), Universidade de Göttingen, Alemanha, são: estirpe tipo 1 (SAG 2063) isolado de esterco de rebanhos sem histórico de mastite associada à prototecose; estirpe tipo 2 (SAG 2021) isolado de casos clínicos de mastite em vacas em lactação e diagnosticado sorologicamente pelo método ELISA (ROESLER et al.,

2001; ROESLER; HENSEL, 2003); e a estirpe tipo 3 (SAG 2064), a *P. blaschkeae*, originado de onicomicose humana.

Vários autores afirmam ainda que somente o biotipo 2 da *P. zopfii* está associado diretamente com a infecção da glândula mamária bovina (BLASCHKE-HELLMESSEN et al., 1985; BAUMGÄRTNER, 1997; MÖLLER et al., 2007; OSUMI et al., 2007), enquanto os outros biotipos não estão envolvidos com a mastite. Em contrapartida, Marques et al. (2008) e Aouay et al. (2008), relataram a presença do genótipo 3 da *P. zopfii* em seus isolados de mastite bovina. Este resultado sugere que não somente o genótipo 2 está associado à mastite, mas outros biotipos também podem estar associados.

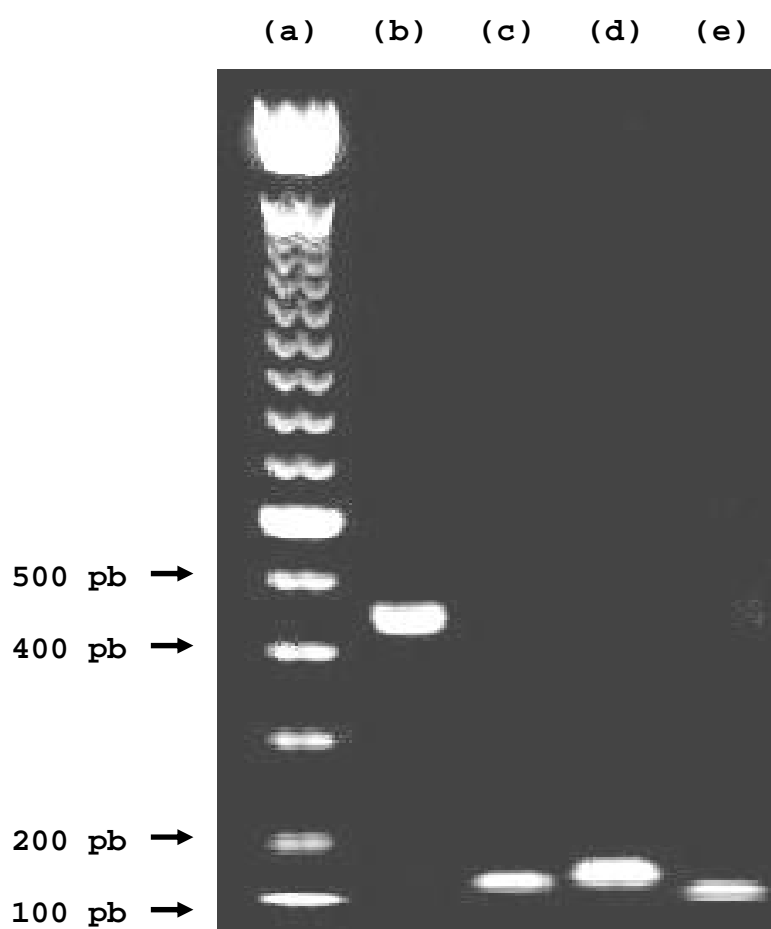


Figura 17 - Visualização dos genótipos 1, 2 e 3 da *P. zopfii*. (a) Padrão DNA 100 – 2.000 pares de base (pb); (b) Primer Interno com 450 pb (controle), (c) Genótipo 1 com 150 pb, (d) Genótipo 2 com 165 pb e (e) Genótipo 3 com 125 pb.

Dos isolados de *P. zopfii* utilizados neste trabalho foram encontrados os três genótipos (1, 2 e 3) do microrganismo, contrariando os resultados dos outros autores e corroborando com os resultados encontrados por Marques et al. (2008) e Aouay et al.

(2008). Ainda é preciso realizar mais estudos de genotipagem da *P. zoppii* e recuperar outros isolados de diferentes regiões do país para verificar a incidência e quais biotipos podem estar realmente envolvidos com a mastite bovina.

5.2 Interação da *P. zoppii* e neutrófilos recuperados de leite bovino

5.2.1 Viabilidade dos neutrófilos por exclusão em azul de Trypan

Os neutrófilos recuperados do leite apresentaram viabilidade celular acima de 98%, sendo consideradas vivas as células não coradas e mortas as que ficaram totalmente azuis, como ilustra a Figura 18 (ABSOLOM, 1986).

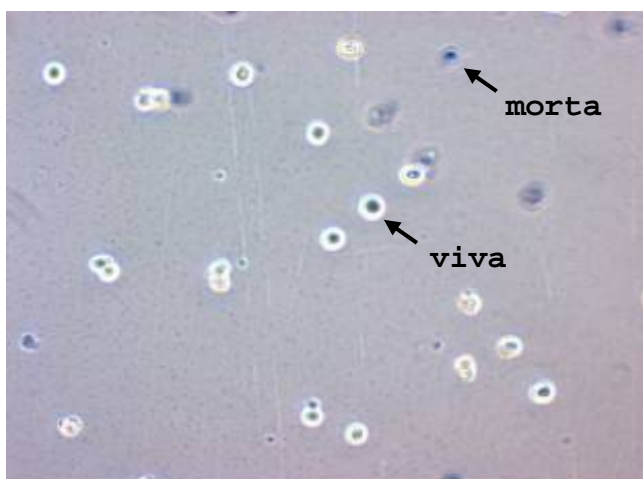


Figura 18 – Avaliação da viabilidade de neutrófilos no microscópio óptico em câmara de Neubauer, utilizando azul de Trypan como corante: as células azuis foram consideradas mortas, (400x).

A técnica de exclusão em azul de Trypan é baseada no princípio de que células com membranas intactas excluem o corante azul de Trypan, enquanto células com danos na membrana deixarão passar o corante e o citoplasma ficará corado (HARBELL et al. 1997). A análise por exclusão em azul de Trypan é uma técnica muito usada na pesquisa para avaliar a integridade de membrana e conseqüentemente a viabilidade celular (MÜLLER, 1984; STEFFENSEN et al., 1994).

5.2.2 Produção de peróxido de hidrogênio e atividade específica de enzimas antioxidantes produzidas pelos neutrófilos

A produção de H_2O_2 e atividade específica das enzimas antioxidantes por neutrófilos de leite incubados por 45 minutos na ausência e presença da alga estão mostrados na Figura 19. A produção de peróxido de hidrogênio pelo neutrófilo ($2,0 \times 10^7$ células/mL) na presença da alga ($2,4 \times 10^8$ UFC/mL) foi estimulada 5 vezes em relação ao controle e estimulou, também, a atividade das enzimas catalase em 21% e glutaciona redutase em 27% por estas células; representativo do estresse oxidativo gerado nos neutrófilos na presença desta alga (CUNHA et al., 2006).

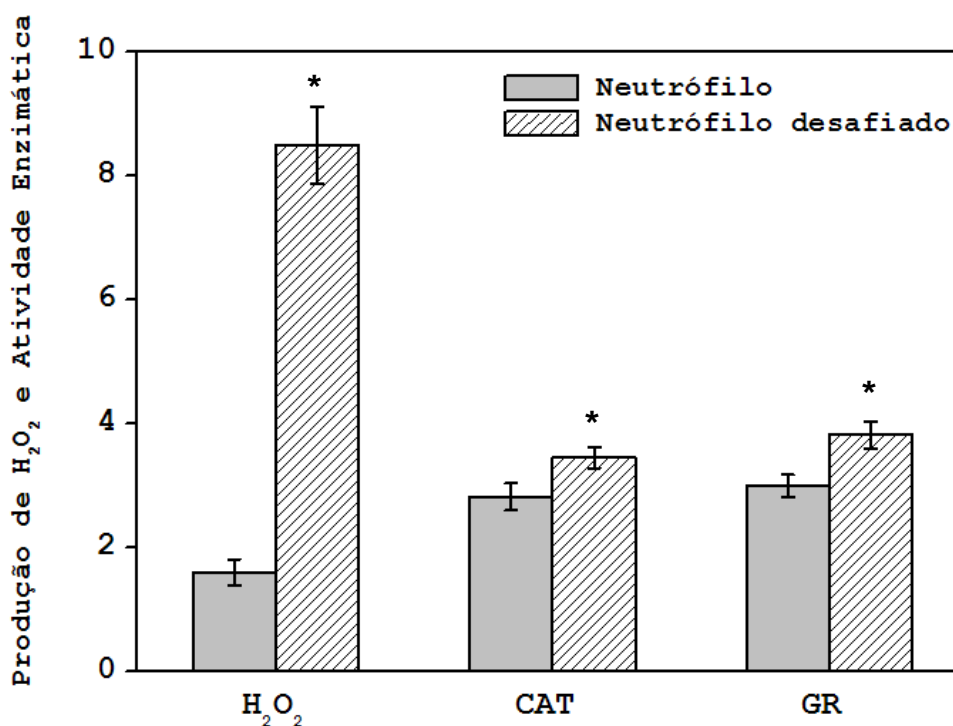


Figura 19 - Efeito da *P. zoppii* na produção de peróxido de hidrogênio (μM por 10^7 células) e atividade de catalase (CAT, $\mu mol/min$ por 1,0 mg de proteína) e glutaciona redutase (GR, $nmol/min$ por 0,1 mg de proteína) de neutrófilos de leite bovino. Os valores são apresentados como média e desvio padrão de seis determinações de três experimentos. *Diferença significativa em relação ao respectivo controle (neutrófilo, $P \leq 0,05$).

Espécies reativas produzidas por células de defesa, como os neutrófilos, quando ativadas por microrganismos patogênicos atuam como microbicidas; sendo, portanto, um importante meio de proteção orgânica contra infecções (HALLIWELL & GUTTERIDGE,

1999). Neste experimento observou-se que o neutrófilo apresentou uma ativação extremamente aumentada no seu metabolismo de geração de H_2O_2 , um metabólito importante no processo de lise do microrganismo, e ao mesmo tempo ativou o sistema antioxidante endógeno em sua própria defesa contra a espécie reativa. Os neutrófilos foram parcialmente protegidos da toxicidade das espécies reativas devido ao aumento discreto na atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutaciona redutase, podendo ter sido protegido inclusive pelas enzimas superóxido dismutase e glutaciona peroxidase não quantificadas neste experimento.

A explosão respiratória em leucócitos é caracterizada pela ativação da oxidase associada à membrana dependente do NADPH que produz ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a partir do oxigênio (O_2). O ânion superóxido pode conseqüentemente ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (HO^{\bullet}) e o oxigênio singlete (1O_2), dentre outras (PICK; MIZEL, 1981; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Além dos radicais livres gerados pelo estresse oxidativo durante a defesa contra os microrganismos, é preciso ser lembrado que os neutrófilos também podem produzir o ácido hipocloroso, um oxidante tóxico, pela ação da mieloperoxidase presente no fagossomo (BABIOR, 1992; SEGAL; ABO, 1993), não quantificado neste trabalho.

5.2.3 Atividade específica de enzimas antioxidantes produzidas pela *P. zopfii*

Os resultados indicaram que não houve diferença significativa quanto à atividade específica de Catalase, Glutaciona Redutase e Superóxido Dismutase em *P. zopfii* após incubação com neutrófilo em relação aos microrganismos não desafiados (Figura 20).

Este estudo mostra que apesar do aumento da produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos na presença da *P. zopfii*, e até mesmo de outros oxidantes tóxicos que podem ter sido geradas nesse confronto, as espécies reativas não foram suficientemente capazes ou não foram geradas em quantidades suficientes para agir sobre o microrganismo.

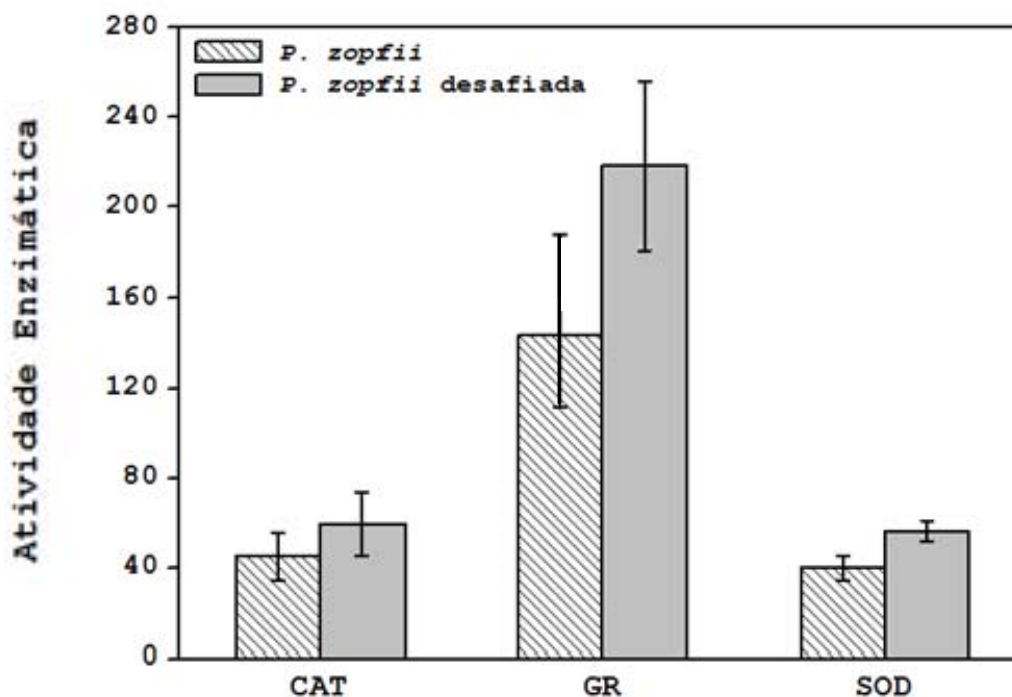


Figura 20 - Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT, $\mu\text{mol}/\text{min}$ por 1 mg de proteína), glutiona redutase (GR, nmol/min por 1 mg de proteína) e superóxido dismutase (SOD, $\mu\text{mol}/\text{min}$ por 1 mg de proteína) da *P. zopfii* desafiada com o neutrófilo.

5.2.4 Capacidade fagocitária dos neutrófilos sobre a *P. zopfii*

A capacidade fagocitária foi avaliada em neutrófilos incubados por 45 minutos na presença da *P. zopfii* e analisada por microscópio de fluorescência (Figura 21). Foi verificada a ausência de morte e o não-englobamento da *P. zopfii* pelo neutrófilo indicado pela ausência de microrganismo fluorescente na região do vermelho e ausência do microrganismo no interior do neutrófilo (Figura 21A). As Figuras 21B e 21C representam a interação entre neutrófilo e *P. zopfii* observada pelo processador de imagens Matlab® v5, Mathworks, Natick, MA. O software padrão de processamento de imagens foi usado em uma única combinação de cores e através de técnicas de reconhecimento padrão para acentuar a visualização das interações entre neutrófilo e *P. zopfii*.

Geralmente, a ativação de neutrófilos por microrganismos opsonizados promove a fagocitose. Contudo, muitos microrganismos têm desenvolvido estratégias eficientes de fuga da resposta imune natural do hospedeiro (PERMPANICH, KOWOLIK, GALLI, 2006) e a *P. zopfii* mostrou uma resistência peculiar em relação à fagocitose (KIRK, 1991; COSTA et al., 1996b). Os mecanismos moleculares usados pelos patógenos para evitar que morram pelo

sistema imune ainda permanece não muito bem elucidado. Quando o microrganismo atravessa a barreira epitelial e começa a se multiplicar no hospedeiro, é imediatamente reconhecido pelos fagócitos mononucleares (macrófagos) que residem nos tecidos e os primeiros a encontrarem os patógenos, porém, sua ação é rapidamente reforçada pelo recrutamento de grandes quantidades de neutrófilos ao sítio da infecção. Neste estudo, foi observada uma tentativa dos neutrófilos recuperados de leite bovino fagocitarem as *P. zopfii* devido à interação e adesão entre as duas células, mas seus tamanhos celulares se mostram semelhantes, o que poderia ser uma explicação do impedimento do processo de englobamento e morte destas algas, explicando também a ineficiência da resposta imunológica do animal frente a uma infecção por *P. zopfii*.

Walsh, Johnson & Tahan (1998) relatam que a susceptibilidade do organismo à prototecose pode estar relacionada com a inabilidade dos leucócitos polimorfonucleares em efetivamente erradicar os microrganismos por fagocitose. Contudo, Jensen et al. (1998) observaram, por microscopia eletrônica, esfregaços de epitélio da glândula mamária nos primeiros estágios de infecção, e encontraram células vivas de *P. zopfii* dentro de macrófagos e neutrófilos, evidenciando a resistência do microrganismo frente à defesa animal. Entretanto, na reprodução assexuada da *P. zopfii*, as células passam por diferentes estágios de desenvolvimento e tamanhos, e provavelmente quando o esporângio atinge a maturidade, atinge também o mesmo tamanho das células de defesa impedindo, assim, o mecanismo de fagocitose. Em humanos, PHAIR et al. (1981) relataram que neutrófilos podem defender o organismo através do englobamento e morte da *Prototheca wickerhamii*.

Interações entre neutrófilos e microrganismos têm sido estudadas há algum tempo. Salyers e Whitt (1994) citado por Mayer-Scholl, Averhoff & Zychlinsky (2004) relatam que a cápsula presente na parede celular de *S. aureus* impede a fagocitose pelos neutrófilos e inclusive sugere que a quantidade de cápsulas está diretamente envolvida com a virulência do microrganismo. Outro exemplo interessante é a interação do neutrófilo e a bactéria *Anaplasma phagocytophilum* em que, após a fagocitose, o patógeno sobrevive, multiplica-se e impede a célula de gerar espécies reativas frente a qualquer outro estímulo reduzindo a sua função de defesa. Estudos ainda são necessários para explicar melhor a interação entre leucócitos bovinos e as diferentes espécies de *Prototheca* sp., especialmente a *P. zopfii*.

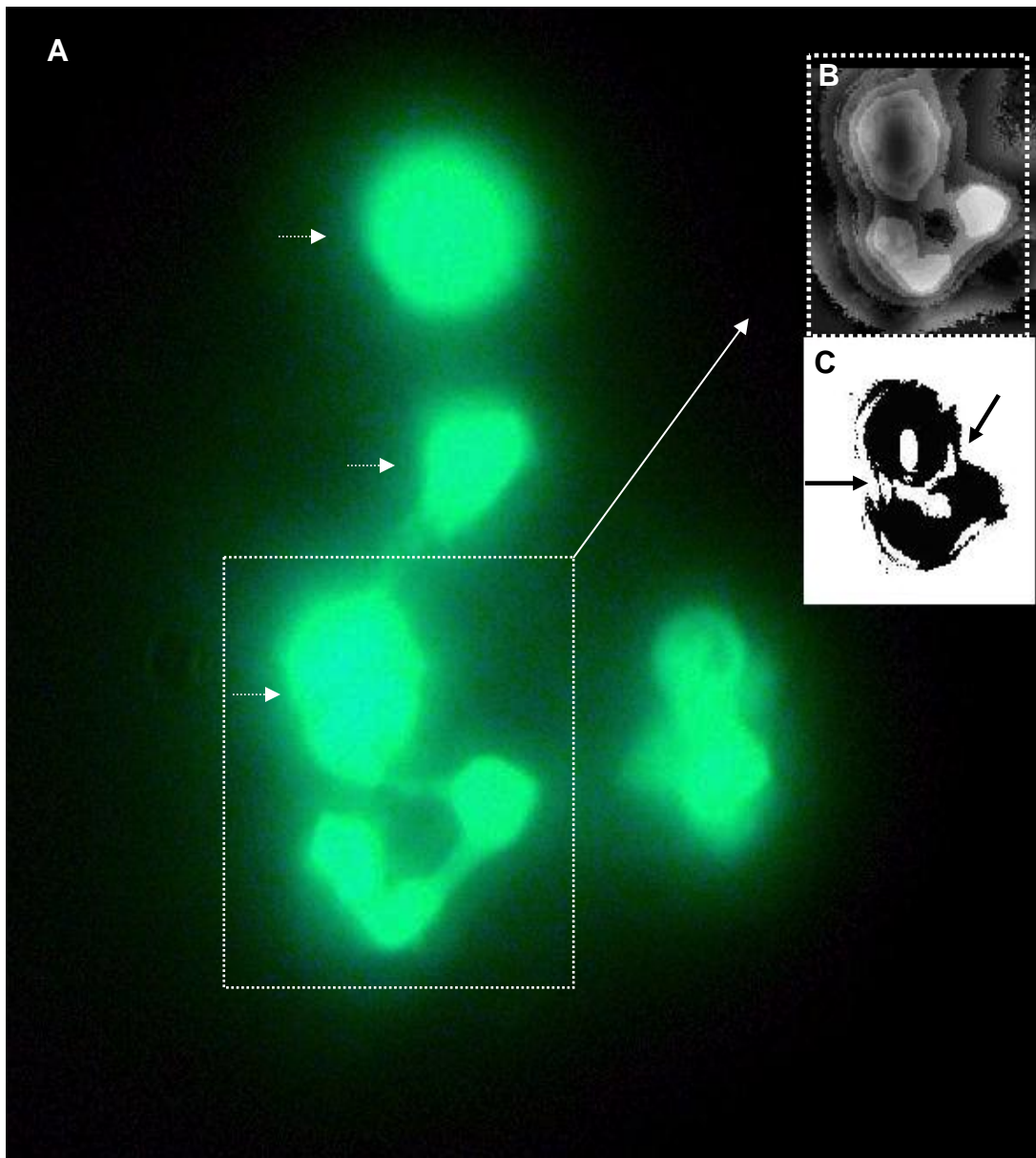


Figura 21 - Imagem obtida por microscopia de fluorescência (excitação em 473 nm, emissão em 580 nm e coloração com laranja de acridina; 1000x). Neutrófilo de leite bovino após incubação com *P. zopfii*: (A) imagem fluorescente contendo neutrófilos viáveis (núcleo lobulado corado de verde) e *P. zopfii* viva (verde) (as setas indicam os microrganismos), (B e C) Imagens processadas pelo Matlab® mostrando a interação entre neutrófilo e *P. zopfii* (as setas indicam o ponto de adesão do neutrófilo e o microrganismo). Várias imagens foram obtidas de 50 neutrófilos por cada lâmina e a imagem apresentada foi uma ilustração de três experimentos.

5.2.5 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias da *P. zopfii*

Os resultados da contagem das Unidades Formadoras de Colônias antes e após a incubação da *P. zopfii* e neutrófilos estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Unidades formadoras de colônias (UFC x 10²/mL) da *P. zopfii* contadas antes e após incubação com neutrófilo de leite bovino.

	Unidades Formadoras de Colônias	
	Antes da incubação (x10 ²)	Após incubação (x10 ²)
<i>P. zopfii</i> (Controle)	6,1 ± 3,0	7,4 ± 2,3
<i>P. zopfii</i> + Neutrófilos	7,0 ± 2,4	7,4 ± 2,8

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey. Os valores foram apresentados com as médias e desvios-padrão de sete determinações de três experimentos.

Igualmente ao estudo da capacidade fagocitária, os resultados mostraram que neutrófilos não promovem a morte de *P. zopfii*. Não houve diferença significativa no crescimento das colônias antes e depois da incubação da *P. zopfii* com neutrófilos quando comparado ao controle (*P. zopfii* incubada sem a presença de neutrófilos).

5.3 Viabilidade da *P. zopfii* frente ao sistema AIA/HRP

5.3.1 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias da *P. zopfii*

Na Figura 22 encontram-se os resultados obtidos para a contagem de colônias de *P. zopfii* em placas após incubação do microrganismo em PBS na ausência (controle) e presença de AIA, HRP e AIA/HRP nos tempos 0, 3, 4, 6 e 9 horas. O sistema AIA/HRP inibiu o crescimento do microrganismo em 48, 75 e 83% nos tempos de 4, 6 e 9 horas de incubação, respectivamente, em relação ao controle nos respectivos tempos ($P \leq 0,05$). Estes resultados demonstram o efeito deletério do AIA quando combinado com HRP sobre a *P. zopfii*, sendo que nem o AIA e nem o HRP individualmente modificaram a formação de colônias destes microrganismos. Para ilustração, fotos das placas com as colônias de *P. zopfii* crescidas em ágar *Sabouraud* dextrose após exposição ao sistema AIA/HRP por 0, 3, 4, 6 e 9 horas podem ser observadas na Figura 23. A inibição da formação de colônias de *P.*

zopfii começou a ser observada após 4 horas de incubação na presença do sistema, comparado ao crescimento da alga nos outros tratamentos.

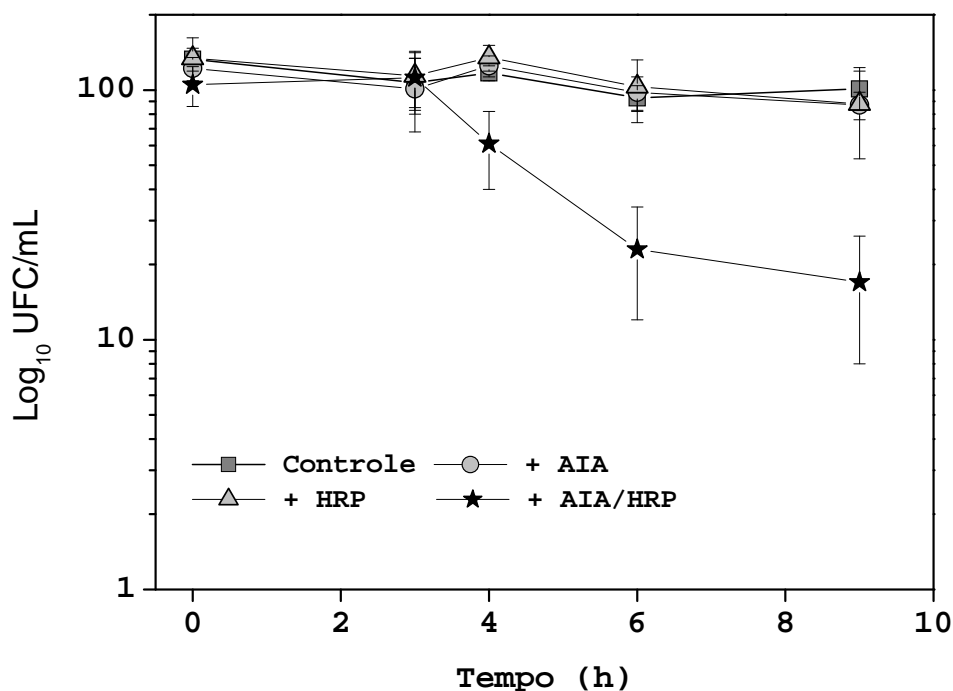


Figura 22 – Unidades formadoras de colônias (\log_{10} UFC/mL) de *P. zopfii* cultivada em ágar *Sabouraud* dextrose durante 48 horas após incubação em PBS (0, 3, 4, 6 e 9 horas) na ausência (Controle) e presença de AIA, HRP ou sistema AIA/HRP. Os resultados foram expressos com média \pm desvio-padrão (n = 9).

O AIA combinado com HRP produz uma ação microbicida eficiente contra a *P. zopfii* revelado pelo seu efeito citotóxico após o crescimento de colônias. Atualmente existem poucos trabalhos científicos que relatam o efeito do sistema AIA/HRP sobre microrganismos. Pugine (2008), estudando o efeito microbicida do sistema AIA/HRP, observou uma inibição da formação de colônias de *S. aureus* após 1,5 horas de incubação na presença do sistema e de catalase, mostrando que o peróxido de hidrogênio não está envolvido nos mecanismos de lise do microrganismo.

Folkes e Wardman (2001), Greco et al. (2000) e Wardman (2002) observaram que o AIA na presença de HRP é citotóxico para células tumorais humanas. Compostos que apresentam citotoxicidade geralmente não são seletivos para células tumorais e sua eficácia terapêutica fica limitada em decorrência ao dano que podem causar às células e tecidos normais, além da possível resistência após tratamento prolongado (DENNY, 2001; XU;

McLEOD, 2001). Estratégias já estão sendo estudadas na tentativa de superar as limitações quanto aos danos sobre células normais e uma alternativa é a técnica ADEPT (*antibody-directed enzyme prodrug therapy*), em que a enzima pode converter compostos atóxicos em químicos ativos para agirem seletivamente em células alvo.

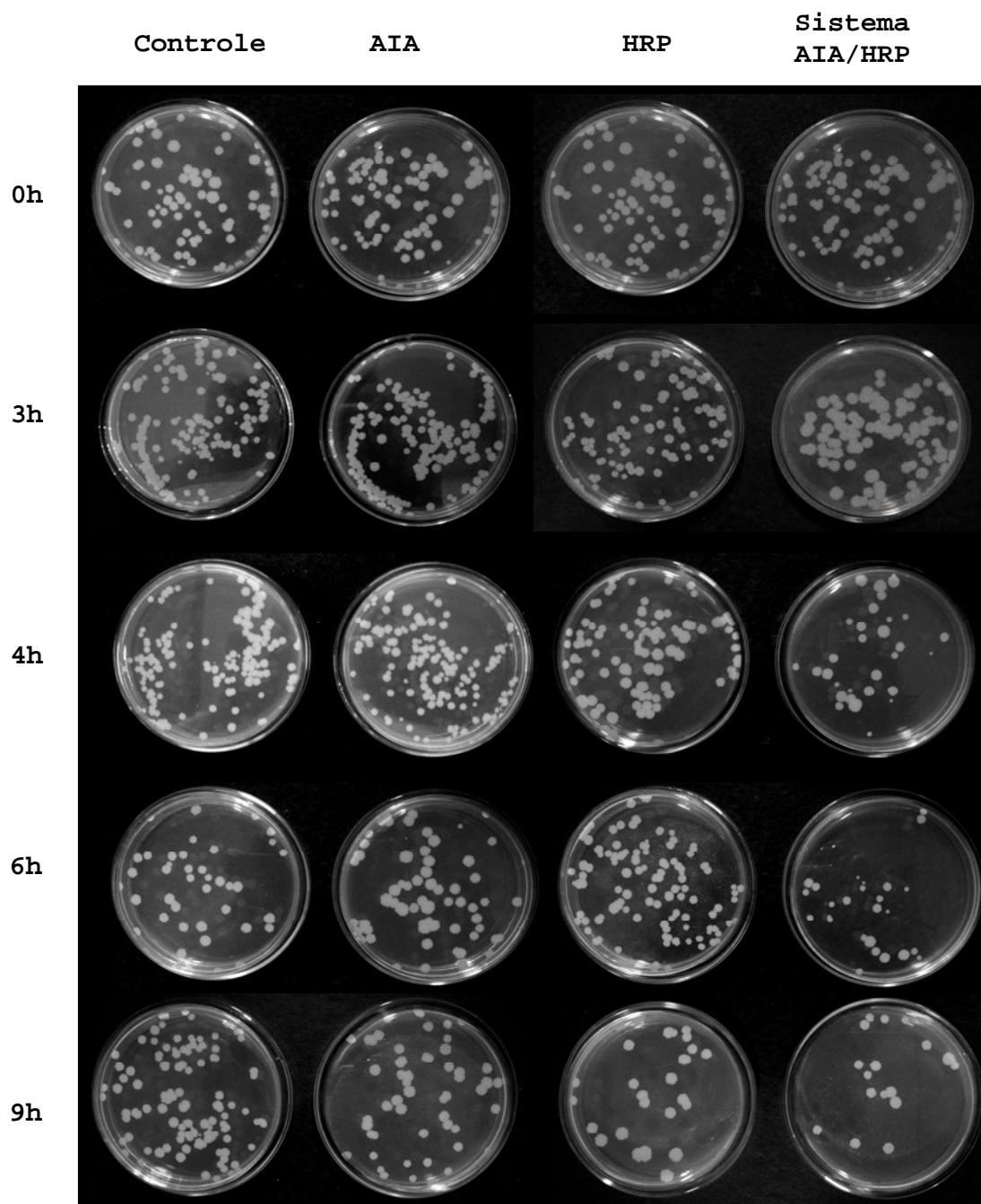


Figura 23 - Crescimento da *P. zopfi* incubada por 0, 3, 4, 6 e 9 horas em PBS na ausência (controle) e presença de AIA, HRP e AIA/HRP, avaliado após 48 horas de cultivo em ágar *Sabouraud* dextrose.

5.3.2 Atividade específica de enzimas antioxidantes produzidas pela *P. zopfii*

A *P. zopfii* exposta ao sistema AIA/HRP apresentou um aumento considerável na atividade específica das enzimas antioxidantes após 6 horas de incubação (Figura 24). A atividade da SOD, CAT, GR e GPx aumentou respectivamente em 90, 120, 150% e 3,4 vezes quando comparado ao controle. A incubação da *P. zopfii* com AIA ou HRP individualmente não alterou a atividade das enzimas antioxidantes.

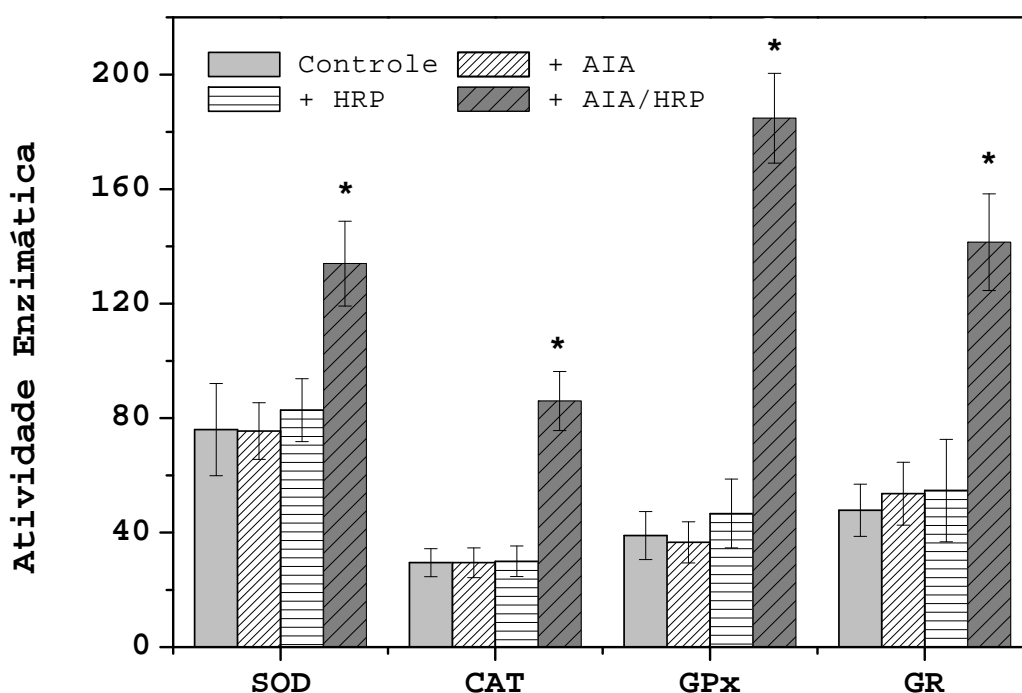


Figura 24 – Atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) em *P. zopfii* após incubação durante 6 horas do microrganismo em PBS na ausência (controle) e presença de AIA, HRP ou sistema AIA/HRP. Os valores foram apresentados como média e desvio-padrão para 6 experimentos (n=6). Atividade de SOD, CAT e GPx foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}$ por miligrama de proteína. Atividade de GR foi expresso em nmol/min por miligrama de proteína $\times 10$. *Diferença significativa em relação ao respectivo controle (neutrófilo, $P \leq 0,05$).

O AIA é metabolizado pela HRP e esta combinação resulta na produção de diversas espécies reativas (CANDEIAS; WARDMAN; MASON, 1997). Estudos sugerem que a toxicidade do sistema é devido à ação do 3-metileno-2-oxindol (MOI), conhecido como um

produto da reação entre HRP e AIA que mostra alta reatividade para células (FOLKES; WARDMAN, 2001). Ainda estudos mostram que o indol-3-carbinol, produto formado da oxidação do AIA pelo HRP (FOLKES; WARDMAN, 2001) tem uma atividade antimicrobiana *in vitro* contra espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas, e fungos, e pode exercer atividade antifúngica pelo rompimento da estrutura que compõe a membrana celular (SUNG; LEE, 2005).

Algumas investigações sugerem que há uma grande interação entre as espécies reativas relacionadas com o mecanismo AIA/HRP (KIM et al., 2006). Deste modo, promover a produção de espécies reativas pode induzir a uma condição de estresse oxidativo que se torna importante para a morte celular (VALKO et al., 2007). Neste estudo, foi observado que a combinação do AIA com HRP foi tóxica para a *P. zopfii*, sugerindo que o sistema induziu estresse oxidativo no microrganismo demonstrado pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes. As enzimas antioxidantes, SOD, CAT, GPx e GR, neste estudo, se tornaram indicadores sensíveis do aumento do estresse oxidativo e a atividade aumentada destas enzimas deve proteger e eliminar espécies reativas (DE MELO et al., 2004).

5.3.3 Integridade de membrana da *P. zopfii* por exclusão em azul de Trypan

A integridade de membrana da *P. zopfii* pode ser observada na Figura 25 em que células não-coradas foram consideradas células vivas e células coradas em azul consideradas mortas através da exclusão em azul de Trypan.

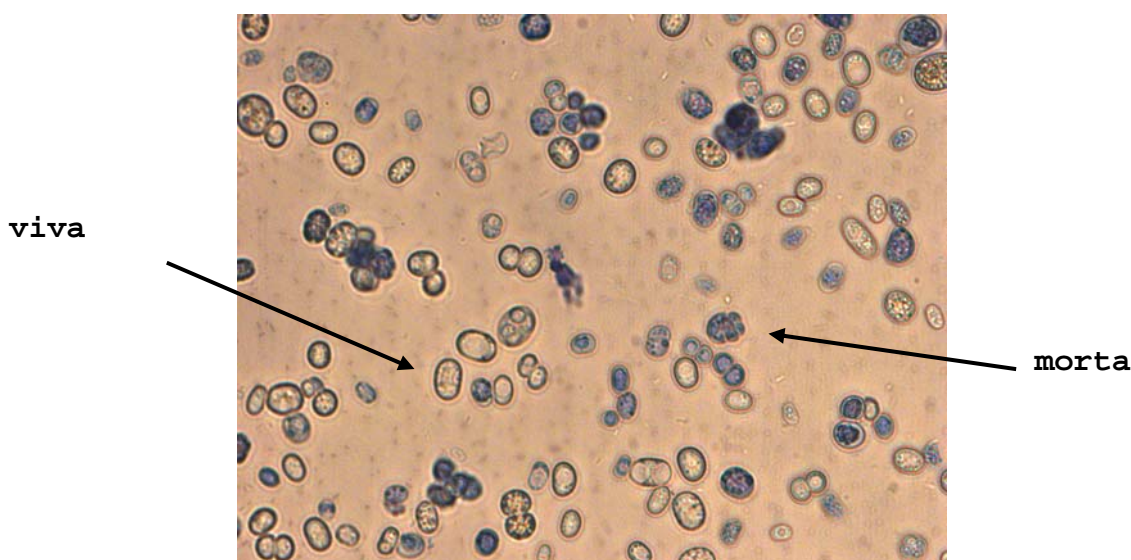


Figura 25 – Imagem da *P. zopfii* observada em microscópio óptico utilizando o corante azul de Trypan (400x).

A ação do sistema AIA/HRP sobre a *P. zopfii* para a morte celular foi observada com 12 horas de incubação (Figura 26). Os resultados mostraram que a combinação do AIA/HRP reduziram eficientemente a viabilidade da *P. zopfii* em 10, 15, 20, 25 e 32% após os tempos de 4, 6, 8, 10 e 12 horas de incubação respectivamente em comparação a cada controle ($P \leq 0,05$). Nem AIA e nem HRP individualmente foram capazes de modificar a viabilidade celular da *P. zopfii*.

A perda da integridade de membrana ocasiona a uma redução drástica na polarização da membrana e estas alterações estão diretamente relacionadas com a viabilidade do microrganismo (KNOWLES; CASTENHOLZ, 2008). O potencial de membrana é responsável pela geração da força próton-motiva através da membrana celular durante a produção de energia (NOVO et al., 1999). Em trabalhos realizados por Pugine (2008), resultados mostraram que o sistema AIA/HRP aumentou a permeabilidade da membrana e reduziu o potencial de membrana de *S. aureus*, sugerindo que o sistema foi eficiente na morte deste microrganismo. Outros estudos demonstram que antimicrobianos comuns usados contra infecções por *S. aureus* tais como daptomicina também alteram a membrana celular (COTTAGNOUD, 2008).

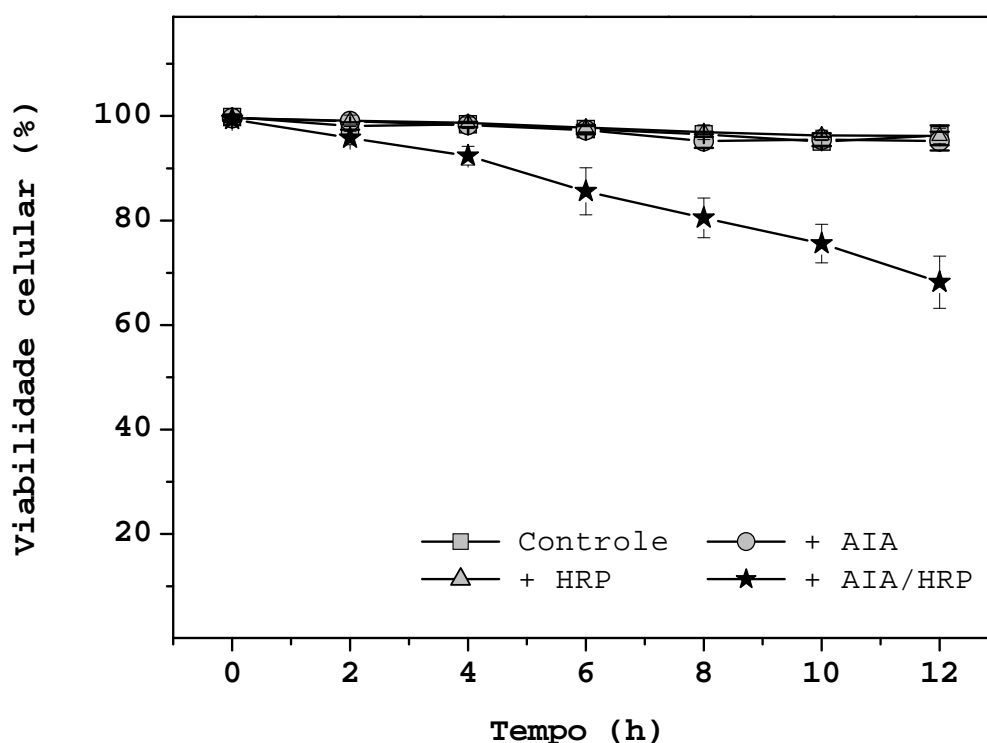


Figura 26 – Viabilidade celular da *P. zopfii* incubada na ausência (controle) e presença de AIA, HRP ou sistema AIA/HRP durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 horas. Os resultados foram expressos com média e desvio-padrão (n=9).

Testes de suscetibilidade *in vitro* contra *P. zopfii* realizados por Melville et al. (2002) mostraram que células expostas ao nitrato de prata tiveram a sua espessura de parede celular alterada; quando tratadas com sulfato de cobre apresentaram fibrilação da camada interna da parede celular; e quanto expostas à clorexidina houve degradação de organelas intra-celulares. Tortorano et al. (2008), estudando a atividade *in vitro* de antifúngicos e essências naturais contra *Prototheca* sp., encontraram susceptibilidade do microrganismo aos compostos explicada pela presença de ergosterol na fração lipídica neutra das membranas celulares das espécies de *Prototheca*.

Neste estudo, o efeito tóxico produzido pelo sistema AIA/HRP sobre a *P. zopfii* foi revelado pela redução da viabilidade celular em parte devido às lesões que podem ter sido ocasionadas na membrana, evidenciado pela entrada do azul de Trypan na célula corando-a de azul. Assim, o sistema AIA/HRP parece ter ação microbicida eficiente sobre a *P. zopfii*, corroborando com os efeitos também encontrados na formação de colônias.

5.3.4 Integridade do DNA da *P. zopfii*

O sistema AIA/HRP não afetou a integridade do DNA da *P. zopfii* (Figura 27) após 6 horas de incubação, avaliada por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 10% e corado com nitrato de prata 0,2%. Este resultado sugere que o sistema é eficiente na morte do microrganismo por alterações metabólicas sem induzir a fragmentação do DNA.

Já foi encontrada fragmentação de DNA em células humanas expostas ao mesmo sistema AIA/HRP (KIM; JEON; PARK, 2004). Alterações podem ser encontradas pelo uso de outros compostos sobre o DNA, como por exemplo, microbicidas de amplo espectro, o nitromidazol, que age na estrutura do DNA de bactérias anaeróbias e protozoários, promovendo a morte do microrganismo (EDWARDS, 1993). Atualmente não são encontrados relatos de lesões no DNA de microrganismos causados pela ação do sistema AIA/HRP.

Embora este trabalho tenha mostrado resultados satisfatórios em relação ao efeito microbicida que o sistema AIA/HRP exerce contra a *P. zopfii*, estudos ainda são necessários para se determinar a concentração mínima inibitória em experimentos *in vitro* e também realizar experimentos de susceptibilidade *in vivo*. Estudos realizados diretamente no animal seriam necessários para avaliar se estes antimicrobianos poderiam se tornar alternativas de tratamento e prevenção da prototecose associada à mastite bovina.

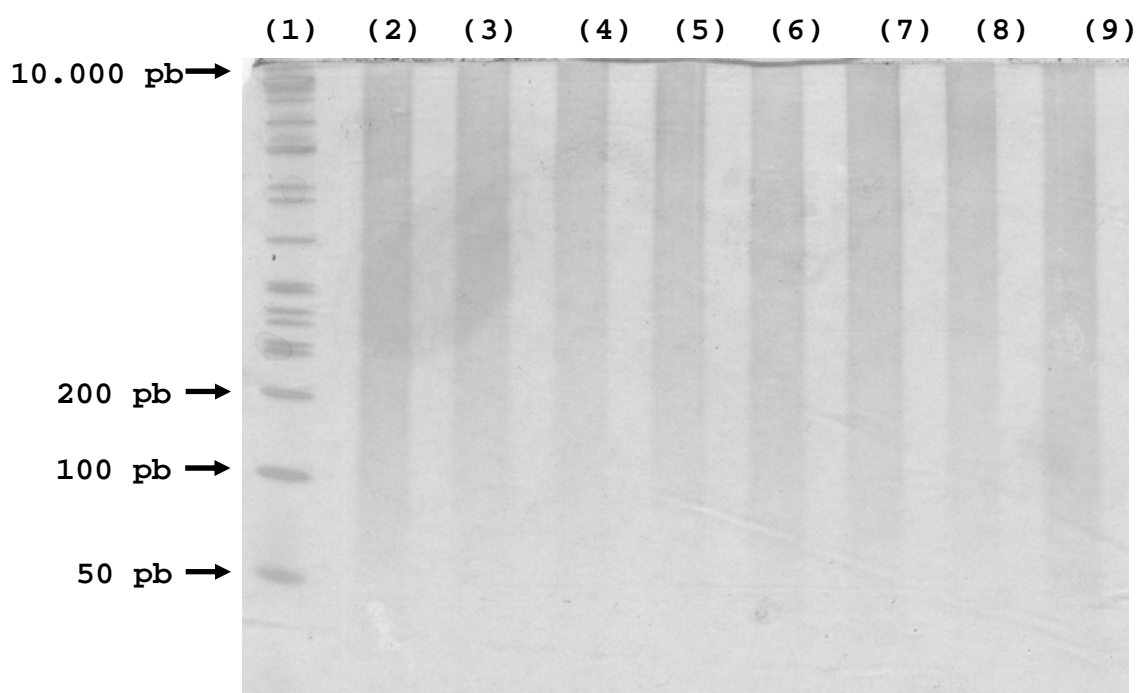


Figura 27 - Ação do sistema AIA/HRP na integridade do DNA da *P. zopfii* após 6 horas de incubação em PBS: (1) Padrão DNA de 50 a 10.000 pares de base (pb); (2) *P. zopfii* sem incubação (tempo zero); (3) *P. zopfii* na presença de AIA sem incubação (tempo zero); (4) *P. zopfii* na presença de HRP sem incubação (tempo zero); (5) *P. zopfii* na presença do sistema AIA/HRP sem incubação (tempo zero); (6) *P. zopfii* após incubação; (7) *P. zopfii* na presença de AIA após incubação; (8) *P. zopfii* na presença de HRP após incubação; (9) *P. zopfii* na presença do sistema AIA/HRP após incubação. Os resultados são ilustrativos de três repetições (n=3) em que todas apresentaram as mesmas características.

6 CONCLUSÕES

Através dos estudos apresentados neste trabalho, pode-se concluir que:

- A *P. zopfii* recuperada de vacas com mastite clínica foi caracterizada quanto à morfologia celular e de colônias conforme descrito na literatura;
- A *P. zopfii* é altamente resistente, mesmo em meio mínimo, o que explica a sua sobrevivência no ambiente e elevada disseminação entre os animais;
- Foram encontrados os genótipos 1, 2 e 3 nos isolados de *P. zopfii* recuperados de vacas com mastite de rebanhos do sul de Minas Gerais, implicando assim na necessidade de realização de mais estudos de genotipagem, de outros isolados e de outras regiões do país, para melhor caracterizar a epidemiologia desta infecção;
- A *P. zopfii* é resistente frente aos neutrófilos, o que explica a falta de defesa natural contra este microrganismo, principalmente pelo sistema imune celular fagocítico, e as lesões irreversíveis na glândula mamária;
- A *P. zopfii* demonstrou ser susceptível quanto ao efeito microbicida do sistema AIA/HRP *in vitro*, resultado importante para a continuidade da pesquisa na tentativa de se desenvolver estratégias de aplicação deste sistema *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSOLOM, D.R. Basic methods for the study of phagocytosis. **Methods in Enzymology**, v.132, p.95–180, 1986.

ALONSO LOMILLO, M.A.; KAUFFMANN, J.M.; ARCOS MARTINEZ, M.J. HRP-based biosensor for monitoring rifampicin. **Biosensors and Bioelectronics**, v.18, p.1165-1171, 2003.

ANDERSON, K.L.; WALKER, R.L. Sources of *Prototheca* spp. in a dairy herd environment. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.193, p. 553-556, 1988.

AOUAY, A.; COPPÉE, F.; CLOET, S.; CUVELIER, P.; BELAYEW, A.; LAGNEAU, P.-E.; MULLENDER, C. Molecular characterization of *Prototheca* strains isolated from bovine mastitis. **Journal de Mycologie Médicale**, v.18, p.224—227, 2008.

AYDIN, A.; ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z.; SAYAL, A.; EKEN, A.; ERDEM, O.; ERTEN, K.; OZGOK, Y.; DIMOVSKI, A. Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Clinical Biochemistry**, v.39, p.176-179, 2006.

BABIOR, M.B. The respiratory burst oxidase. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v.65, p.49-95, 1992.

BALDASSI, L.; FERNANDES FILHO, M.; HIPÓLITO, M.; MOULIN, A.A.P.; CALIL, E.M.B.; PIRES, D.C. Etiologia da mastite subclínica na bacia leiteira de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.58, p.29-36, 1991.

BARBIER-BRYGOO, H. Tracking auxin receptors using functional approaches. **Critical Reviews in Plantarum**, v.14, p.1-25, 1995.

BARSZCZ, J.C.; LIMA, I., KOVALESKI, J.L. **A qualidade do leite com base na contagem de células somáticas e na Instrução Normativa nº. 51: um estudo de caso da indústria Lactobom e seus produtores.** Revista Produção Online, 5, 2005. Disponível em: <<http://producaoonline.org.br/index.php/rpo/article/view/36>>. Acesso em 24 jul. 2009.

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical biochemistry**, v.198, p.217, 1991.

BAUCHER, M.; CHRISTENSEN, J.H.; MEYERMANS, H.; CHEN, C.; VAN DOORSSELAERE, J.; LEPLÉ, J.C.; PILATE, G.; PETIT-CONIL, M.; JOUANIN, L.; CHABBERT, B.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Applications of molecular genetics for biosynthesis of novel lignins. **Polymer Degradation and Stability**, v.59, p.47-52, 1998.

BAUMGÄRTNER, B. Vorkommen und Bekämpfung der Protothekenmastitis des Rindes im Einzugsgebiet des Staatlichen Veterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamtes **Potsdamer Prakt Tierarzt**, v.78, p.406–414, 1997.

BEERS, R.F.; SIZER, J.W. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.133-140, 1952.

BENITES, N.R. **Estudo dos aspectos microbiológicos e histopatológicos da mastite infecciosa bovina**. São Paulo, 1996. 169 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1996.

BERGLUND, G.I.; CARLSSON, G.H.; SMITH, A.T.; SZÖKE, H.; HENRIKSEN, A.; HAJDU, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. **Nature**, v.417, p.463–468, 2002.

BEUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.

BEXIGA, R.; CAVACO, L.; VILELA, C.L. Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino. **Revista Portuguesa de Ciências**, v.98, p.33-37, 2003.

BIANCO, C.; IMPERLINI, E.; CALOGERO, R.; SENATORE, B.; PUCCI, P.; DEFEZ, R. Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.152, p.2421–2431, 2006.

BIELSKI, B.H.J.; GEBICKI, J.M. Study of peroxidase mechanisms by pulse radiolysis. III The rate of reaction of $O_2^{\cdot-}$ and HO_2 radicals with horseradish peroxidase compound I. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.364, p.233-235, 1974.

BLASCHKE-HELLMESSEN, R.; SCHUSTER, H.; BERGMANN, V. Differenzierung von Varianten bei *Prototheca zopfii* (Krüger 1894). **Archiv fur Experimentelle Veterinärmed**, v.39, p.387–397, 1985.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAMLEY, A.J.; DODD, F.H. Reviews of the progress of dairy science: mastitis control-progress and prospects. **Journal of Dairy Research**, v.51, p.481-512, 1984.

BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº51 de 12 de julho de 2002**. 2002. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 27 jul. 2009.

BRITO, M.; VEIGA, M. Mastite clínica causada por *Prototheca zopfii*: relato de um caso. **Revista Ciência Rural**, v.27, p.681-684, 1997.

BRUNETTI, I.L.; FARIA-OLIVEIRA, O.M.M. Sistemas quimiluminescentes com peroxidase (EC: 1.11.1.7) e suas aplicações em análises clínicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.16, p.55-77, 1996.

BOZDOGAN, B.; APPELBAUM, P.C. Onxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, p.113-119, 2004.

BUENO, A.L.; CZEPIELEWSKI, M.A. A importância do consumo dietético de cálcio e vitamina D no crescimento. **Jornal da Pediatria**, Porto Alegre, v.84, n.5, 2008.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; DIAS FILHO, F.C. *Prototheca zopfii*: importante patógeno na etiologia da mastite bovina no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.7, n.3, p.273-283, 2006.

BUENO, V.F.F.; MESQUITA, A.J.; NEVES, R.B.S.; SOUZA, M.A.; RIBEIRO, A.R.; NICOLAU, E.S.; OLIVEIRA, A.N. Epidemiological and clinical aspects of the first outbreak of bovine mastitis caused by *Prototheca zopfii* in Goiás State, Brasil. **Mycopathologia**, v.161, p.141-145, 2006.

BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; FACELLI, R.; BAUDINO, R.; CAVARERO, F.; MATTALIA L., MARTINI A. First large-scale isolation of *Prototheca zopfii* from milk produced by dairy herds in Italy. **Mycopathologia**, v.158, p.427-430, 2004.

CARLBERG, I.; MANNERVICK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v.113, p.484-490, 1985.

CAMARGO, Z.P.; FISCHMAN, O. Use of morphophysiological characteristic for differentiation of the species of *Prototheca*. **Sabouraudia**, v.17, p.275-278, 1979.

CANDEIAS, L.P.; FOLKES, L.K.; PORSSA, M.; PARRICK, J.; WARDMAN, P. Enhancement of lipid peroxidation by indole-3-acetic acid and derivatives: substituent effects. **Free Radical Research**, v.23, p.403-418, 1995.

CANDEIAS, L.P.; FOLKES, L.K.; PORSSA, M.; PARRICK, J.; WARDMAN, P. Enhancement of peroxidase-induced lipid peroxidation by indole-3-acetic acid: effect of antioxidants. **Free Radical Research**, v.2, p.141-147, 1996.

CANDEIAS, L.P.; WARDMAN, P.; MASON, R.P. The reaction of oxygen with radical from oxidation of tryptophan and indole-3 acetic acid. **Biophysical Chemistry**, v.67, p.229-237, 1997.

CANO, A.; ALCARAZ, O.; ARNAO, M.B. Free radical-scavenging activity of indolic compounds in aqueous and ethanolic media. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.376, p.33-37, 2003.

CARNEIRO, O. **Construções rurais**. Livraria Nobel. São Paulo, 1989, 719 p.

CARVALHO, G.R.; OLIVEIRA, A.F. **O setor lácteo em perspectiva. Boletim de conjuntura agropecuária. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite**. 23 p. 2006. Disponível em: <http://www.cnpm.embrapa.br/conjuntura/0609_Leitederivados.df. Acesso em 15 jun. 2009.

COBERLLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.; DIAS, M.M.; FERREIRO, L. Bovine mastitis due to *Prototheca zopfii*: clinical, epidemiological and pathological aspects in a brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, v.33, p.463-470, 2001.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Educação Continuada**, v.1, n.1, 1998.

COSTA, E.O.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; PRADA, M.S.; SCHAICH, U. *Prototheca* sp. Outbreak of Bovine Mastitis. **Journal of Veterinary Medicine**, v.43, p.321–324, 1996b.

COSTA, E.O.; GANDRA, C.R.; PIRES, M.F.; COUTINHO, S.D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C.M. Survey on bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.124, p.13-17, 1993.

COSTA, E.O.; GARINO, JR.F.; WATANABE, E.T.; SILVA, J.A.; RIBEIRO, A.R.; HORIUTI, A.M. Patógenos de mastite bovina isolados de glândulas mamárias negativas aos testes de Tamis e CMT. **Revista Napgama**, São Paulo, v.4, p. 12-15, 2001.

COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Relato de um caso de consumo de queijo fresco contaminado por *Prototheca* spp. **Revista Napgama**, São Paulo, v.1, p.9-10, 1998a.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; MELVILLE, P.A. Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. **Journal of Veterinary Medicine**, v.45, p.65-71, 1998b.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; PARDO, R.B.; SILVA, J.B.; SANCHES, R.B. An increased incidence of mastitis caused by *Prototheca* spp. and *Nocardia* spp. on a farm in São Paulo, Brasil. **Veterinary Research Communications**, v.20, p.237-241, 1996a.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; SILVA, J.A.B.; GARINO JÚNIOR, F.; BENITES, N.R.; HORIUTI, A.M. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Revista Napgama**, São Paulo, v.2, p.16-20, 1999.

COTTAGNOUD, P. Daptomycin: a new treatment for insidious infections due to gram-positive pathogens. **Swiss Medical Weekly**, v.138, p.93–99, 2008.

CRISPIN, L.S. *Prototheca zopfii*. Características do agente, marcadores e fatores de virulência. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITES, 3, 1999, Botucatu. **Anais...** Botucatu: FMVZ-Unesp, p.35-41, 1999.

CULLOR, J.S. The control, treatment and prevention of the various types of bovine mastitis. **Veterinary Medicine Food-Animal Practice**, p.571-579, 1993.

CUNHA, L.T.; PUGINE, S.P.; VALLE, C.R.; RIBEIRO, A.R.; COSTA, E.J.X.; DE MELO, M.P. Effect of *Prototheca zopfii* on neutrophil function from bovine milk. **Mycopathologia**, v.162, p.421-426, 2006.

CUNHA, L.T.; PUGINE, S.M.P.; MONTEIRO, M.R.M.; COSTA, E.J.X.; DE MELO, M.P. Microbicidal action of indole-3-acetic acid combined with horseradish peroxidase on *Prototheca zopfii* from bovine mastitis. **Mycopathologia**, v.169, p.99-105, 2010.

DAS, S.K.; VSUDEVAN, D.M. Essential factors associated with hepatic angiogenesis. **Life Science**, v.81, p.1555-1564, 2007.

DAVIES, R.; SPENCER, R.R.; WAKELIN, P.O. A case of human protothecosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, p.448-451, 1964.

DEGASPERI, S.A.R.; PIEKARSKI, P.R.B. **Bovinocultura leiteira**: planejamento, manejo e instalações. 1ed. Curitiba, 1988. p.429.

DE MELO, M.P.; CURI, T.C.P.; CURI, R.; DI MASCIO, P.; CILENTO, G. Peroxidase activity may play a role in the cytotoxic effect of indole acetic acid. **Photochemistry and Photobiology**, v.65, p.338-341, 1997.

DE MELO, M.P., CURI, T.C., MIYASAKA, C.K., PALANCH, A.C. AND CURI, R. Effect of indole acetic acid on oxygen metabolism in cultured rat neutrophil. **General Pharmacology**, v.31, p.573–578, 1998.

DE MELO, M.P.; DE LIMA, T.M.; PITHON-CURI, T.C.; CURI, R. The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. **Toxicology letters**, v.148, p.103–111, 2004.

DENNY, W.A. Prodrug strategies in cancer therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.36, p.577-595, 2001.

DEUSCHLE, R.A.N.; CAMARGO, T.; FRANCESCATO, L.N.; ALVES, S.H.; HEINZMANN, B.M. Antimicrobial activity of *Senecio desiderabilis* Vellozo (Asteraceae). **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.25, n.3, p.356-359, 2006.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control off cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p.47-95, 2002.

DUNFORD, H.B. **Heme peroxidases**. New York: Wiley-VCH, 1999.

DUNFORD, H.B. Horseradish peroxidase: structure and kinect properties. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.; GRISHAM, M.B. **Peroxidases in Chemistry and Biology**, v.2, p.1-24, 1991.

DURÁN, N.; BROMBERG, N.; KUNZ, A. Kinetic studies on veratryl alcohol transformation by Horseradish peroxidase. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.84, p.279-286, 2001.

EBERHART, R.J. Coliform mastitis. **Veterinary Clinical North American Large Animal Practice**, v.6, p.287-300, 1984.

EBERHART, R.J. **New infection in the dry period**. In: ANNUAL MEETING NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 21th, Lousville, USA, 1992, p.16-18.

EDWARDS, D.I. Nitroimidazole drugs—action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.31, p.9–20, 1993.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Leite em números**. Disponível em: <www.cnpqg.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/estatisticas.php>. Acesso em 05 set. 2009.

ESCOBAR, J.A.; VÁSQUEZ-VIVAR, J.; CILENTO, G. Free radicals and excited species in the metabolism of indole-3-acetic acid and its ethyl ester by horseradish peroxidase and by neutrophils. **Photochemistry and Photobiology**, v.55, p.895-902, 1992.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em Saúde Pública. **Revista Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FILIPPSEN, L.F.; MOREIRA, F.B.; SAKASHITA, A.T.; BITTENCOURT, D.R. Prevalência da mastite bovina causada por *Prototheca zopfii* em rebanhos leiteiros, na região norte do Paraná. **Revista Ciência Rural**, v.29, p.87-89, 1999.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FOLKES, L.K.; GRECO, O.; DACHS, G.U.; STRATFORD, M.R.L.; WARDMAN, P. 5-Fluoroindole-3-acetic acid: a prodrug activated by a peroxidase with potential for use in target cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v.63, p.265–272, 2002.

FOLKES, L.K.; DENNIS, M.F.; STRATFORD, M.R.; CANDEIAS, L. P.; WARDMAN, P. Peroxidase catalyzed effects of indole-3-acetic acid and analogues on lipid membranes, DNA, and mammalian cells in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.57, p.375-382, 1999.

FOLKES, L.K.; WARDMAN, P. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species – a potential new role for plant auxins in cancer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v.61, p.129-136, 2001.

FRANDSON, F.R. **Anatomy and physiology of farm animals**. Lea and Febiger. Philadelphia, 1986.

FURUOKA, H.; ANRI, A.; ARITA, Y.; TUZUKI, N.; SATOH, H.; ITAKURA, C. Protothecal mastitis in a cow. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.51, p.197–199, 1989.

GALSTON, A.W.; PURVES, W.K. The mechanism of action of auxin. **Annual Review of Plant Physiology**, v.11, p.239-276, 1960.

GOLIM, M.A.; DEFFUNE, E.; FERREIRA, R.R.; OLIVEIRA, A.P.E.; PADOVANI, C.R., MACHADO, P.E.A. Conjugação e validação de controle isotópico IgG₁-FITC para uso em citometria de fluxo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.29, p.361-368, 2007.

GOMES, A.L.; FERREIRA FILHO, J.B.S. Economias de escala na produção de leite: uma análise dos estados de Rondônia, Tocantins e Rio de Janeiro. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Brasília, v.45, n.3, p.591-619, 2007.

GOMES, M.; DRIEMEIER, D.; FERREIRO, L. Ocorrência de casos de mastite por *Prototheca zopfii* em bovinos no Rio Grande do Sul. **Revista Napgama**, v.2, p.4-8, 1999.

GOMES, S.T. Evolução recente e perspectivas da produção de leite no Brasil. In: GOMES, A.T.; LEITE, J.L.B.; CARNEIRO, A. V. (Eds.). **O agronegócio do leite no Brasil**. Juiz de Fora: Embrapa/CNPGL, 2001. p.49-61.

GONZALEZ, M.J. Lipid peroxidation and tumor growth: an inverse relationship. **Medical Hypotheses**, v.38, p.106-110, 1992.

GORDON, S.A.; BARR, S.; FRY, R.J.M. Origin of urinary auxin in germfree and conventional mouse. **American Journal of Physiology**, v. 222, p. 399-403, 1972.

GRASSO, P.J. Phagocytosis, bacterial activity, and oxidative metabolism of milk neutrophil from dairy cows fed selenium-supplemented and selenium-deficient diet. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, p.269-274, 1990.

GRECO, O.; FOLKES, L.K.; WARDMAN, P.; TOZER, G.M.; DACHS, GU. Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer: horseradish peroxidase/indole-3 acetic acid. **Cancer gene therapy**, v.7, p.1414-1420, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3.ed. Oxford: Oxford Science Publications, 1999. 936p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**, v.186, p.1-85, 1990.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.; KERE, J. Association of enhanced peroxidase activity in induced systemic resistance of cucumber to *Coletotrichum lagenarium*. **Physiology Plant Pathology**, v.20, p.73-82, 1982.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v.92, p.3007-3017, 1998.

HARBELL, J.W.; KNOOTZ, S.W.; LEWIS, R. W.; LOVELL, D. IRAG working group: Cell cytotoxic assays. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, p.79-126, 1997.

HARMON, R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.2103-2112, 1994.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, v.42, p.462-468, 2001.

HOTT, M.C.; CARVALHO, G.R. Análise espacial da concentração da produção de leite no Brasil e potencialidades geotecnológicas para o setor. In: XIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 2007, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: INPE, 2007.

HOUGHTON, P.J.; ZARKA, R.; HERAS, B.; HOULT, J.R. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. **Planta Medica**, v.61, n.1, p.33-36, 1995.

HU, T.; DRYHURST, G. Electrochemical and peroxidase O₂-mediated oxidation of indole-3-acetic acid at physiological pH. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.432, p.7-18, 1997.

HUERRE, M.; RAVISSE, P.; SOLOMON, H.; AVE, P.; BRIQUELET, N.; MAURIN, S.; WUSCHER, N. Human protothecosis and environment. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v.86, p.484-488, 1993.

IACOVIELLO, V.R.; DEGIROLAMI, P.C.; LUCARINI, J.; SUTKER, K.; WILLIAMS, M.E.; WANKE, C.A. Protothecosis complicating prolonged endotracheal intubation: case report and literature review. **Clinical Infectious Diseases**, v.5, p.959-967, 1992.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION - IDF. **Bovine Mastitis**: definition and guidelines for diagnosis. Bulletin of International Dairy Federation, v.211, p.7, 1987.

JÁNOSI, S.; RÁTZ, F.; SZIGETI, G.; KULCSÁR, M.; KERÉNYI, J.; LAUKÓ, T.; KATONA, F.; HUSZENICZA, G. Review of the microbiological, pathological and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. **The Veterinary Quarterly**, v.23, p.58-61, 2001a.

JÁNOSI, S.; SZIGETI, G.; RÁTZ, F.; LAUKÓ, T.; KERÉNYI, J.; TENK, M.; KATONA, F.; HUSZENICZA, A.; KULCSÁR, M.; HUSZENICZA, G. *Prototheca zopfii* mastitis in dairy herds under continental climatic conditions. **The Veterinary Quarterly**, v.23, p.80-83, 2001b.

JENKINS, R.R.; GOLDFARB, A.H. Introduction: oxidant stress, aging and exercise. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v.25, p.210-212, 1993.

JENSEN, H.E.; AALBAEK, B.; BLOCH, B.; HUDA, A. Bovine mammary protothecosis due to *Prototheca zopfii*. **Medical Mycology**, v.36, p.89-95, 1998.

JI, L.L.; STRATMAN, F.W.; LARDY, H.A. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic, training, and acute exercise. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.263, p.150-601, 1988.

JUNIOR, F.B.R.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.103-113, 2004.

KAWAI, K.; SHIMAZAKI, K.; HIGUCHI, H.; NAGAHATA, H. Antibacterial activity of bovine lactoferrin hydrolysate against mastitis pathogens and its effect on superoxide production of bovine neutrophils. **Zoonoses Public Health**, v.54, 160–164, 2007.

KETTLE, A.J.; ANDERSON, R.F.; HAMPTON, M.B.; WINTERBOURN, C.C. Reactions of superoxide with myeloperoxidase. **Biochemistry**, v.46, p.4888-4897, 2007.

KETTLE, A.J., WINTERBOURN, C.C. Superoxide modulates the activity of myeloperoxidase and optimizes the production of hypochlorous acid, **Biochemical Journal**, v.252, p.529-536, 1988.

KIM, D.S.; JEON, S.E.; JEONG, Y.M.; KIM, S.Y.; KWON, S.B.; PARK, K.C. Hydrogen peroxide is a mediator of indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase-induced apoptosis. **FEBS Letters**, v.580, p.1439-1446, 2006.

KIM, D.S.; JEON, S.E.; PARK, K.C. Oxidation of indole-3 acetic acid by horseradish peroxidase induces apoptosis in G361 human melanoma cells. **Cellular Signalling**, v.16, p.81-88, 2004.

KIRK, J.H. Diagnosis and treatment of difficult mastitis cases. **Agri-practice**, v.12, p.15-20, 1991.

KIRK, J.; GLENN, K.; RUIZ, L. *Prototheca zopfii* mastitis on a large, drylot California dairy. **Veterinary Practitioners News**, v.12, p.48-51, 2000.

KIRK, J.; MELLEBERGER, R. **Mastitis control program for *Prototheca* mastitis in dairy cows.** Disponível em: <<http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INFDAMastitisControl/prototheca.pdf>> Acesso em 25 jul. 2009.

KNOWLES, E.J.; CASTENHOLZ, R.W. Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. **FEMS Microbiology Ecology**, v.66, p.261–270, 2008.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena antioxidants redox reactions and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v.30, p.620-650, 2002.

KRÜGER, W. Kurze Charakteristik einiger niedriger Organismen im Saftfluss der Laubbäume. **Hedwigia**, v.33, p.241–266, 1894.

LAGNEAU, P.E. First isolation of *Prototheca zopfii* in bovine mastitis in Belgium. **Journal de Mycologie Médicale**, v.6, p.145-148, 1996.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A.V.; VANDERLEYDEN, J. Indole 3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.8, p.298-300, 2000.

LANGONI, H.; DA SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, p.204-210, 1998.

LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; PINTO, M.P.; LISTONI, F.J.P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.43, n.6, p.507-515, 1991.

LASS-FLORL, C.; MAYR, A. Human protothecosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p.230–342, 2007.

LERCHE, M. Eine durch Algen (*Prototheca*) hervorgerufene Mastites der Kuh. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v.65, p.64-69, 1952.

LINS, P.G; VALLE, C.R.; PUGINE, S.M.P.; OLIVEIRA, D.L.; FERREIRA, M.S.L.; COSTA, E.J.X.; DE MELO, M.P. Effect of indole acetic acid administration on the neutrophils functions and oxidative stress neutrophils, mesenteric lymph node and liver. **Life Sciences**, v.78, p.564-570, 2006.

LISHMAN, A.W. The cow's udder and milk secretion. Department of Animal Science, University of Natal, 1995. Disponível em:
<http://agriculture.kzntl.gov.za/publications/production_guidelines/dairying_in_natal/dairy6_1.htm>. Acesso em 05 set. 2009.

MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MARQUES, S.; SILVA, E.; CARVALHEIRA, J.; THOMPSON, G. Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.4202-4204, 2006.

MARQUES, S.; SILVA, E.; KRAFT, C.; CARVALHEIRA, J.; VIDEIRA, A.; HUSS, VAR.; THOMPSON, G. Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.1941-1945, 2008.

MARTÍNEZ, E.; ARTIGAS, F.; SUÑOL, C.; TUSSEL, J.M.; GELPÍ, E. Liquidchromatographic determination of indole-3-acetic acid and 5-hydroxy-indole-3-acetic acid in human plasma. **Clinical Chemistry**, v.29, p.1354-1357, 1993.

MARTINS, P.C.; ARAÚJO, P.F.C.; YAMAGUCHI, L.C.T.; CARNEIRO, A.V. Análise do desempenho econômico da atividade leiteira em dez regiões dinâmicas do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 41, 2003, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: SOBER, CD-ROM, 2003.

MAYER-SCHOLL, A.; AVERHOFF, P.; ZYCHLINSKY, A. How do neutrophils and pathogens interact? **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p.62–66, 2004.

McDONALD, S.; RICHARD, J.L.; ANDERSON, A.J. Antimicrobial susceptibility of *Prototheca zopfii* isolated from bovine intramammary infections. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p.1079-1080, 1984.

McDONALD, J.S.; RICHARD, J.L.; CHEVILLE, N.F. Natural and experimental bovine intramammary infections with *Prototheca zopfii*. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p.592-595, 1984.

MEKA, V.G.; PILLAI, S.K.; SAKOULAS, G.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L.; DEGIROLAMI, P.C.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING JR., R.C.; GOLD, H.S. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. **The Journal of infectious diseases**, v.190, p.311-317, 2004.

MELVILLE, P.A. **Estudos sobre algas do gênero *Prototheca* isoladas de leite e de infecções intramamárias em bovinos leiteiros.** 1995. 94f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R.; SINHORINI, I.L.; COSTA, E.O. Susceptibility and features of the ultrastructure of *Prototheca zopfii* following exposure to copper sulphate, silver nitrate and chlorexidine. **Mycopathologia**, v.156, p.1-7, 2002.

MELVILLE, P.A.; WATANABE, E.T.; BENITES, N.R.; RIBEIRO, A.R.; SILVA, J.A.B.; GARINO Jr.,F.; COSTA, E.O. Evaluation of the susceptibility of *Prototheca zopfii* to milk pasteurization. **Mycopathologia**, v.146, p.79-82, 1999.

METODIEWA, D.; DUNFORD, H.B. The reactions of horseradish peroxidase, lactoperoxidase, and myeloperoxidase with enzymatically generated superoxide. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.272, p.245-253, 1989.

MILLS, M.H.; FINLAY, D.C.; HADDAD, P.R. Determination of melatonin and monoamines in rat pineal using reversed-phase ion-interaction chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v.564, p.93-102, 1991.

MÖLLER, A.; TRUYEN, U.; ROESLER, U. *Prototheca zopfii* genotype 2 - the causative agent of bovine protothecal mastitis? **Veterinary Microbiology**, v.120, p.370–374, 2007.

MONICI, M. Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. **Biotechnology Annual Review**, v.11, p.227-256, 2005.

MOURÃO, L.R.M.B. **Efeito antioxidante do ácido indol-3 acético sobre fígado de camundongos submetidos à hepatocarcinogênese induzida**. 2007. 105f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

MORSHED, M.H.; HOSSAIN, M.S.; IBRAHIM, M.; SHAFIQUE, M.Z.; HELALI, M.O.H.; SAMAD, A.; ISLAM, M.S.; ISLAM, M.A. Bactéria killing kinetics of the four plant hormones. Pakistan **Journal of Biological Sciences**, v.8, p.1025-1029, 2005.

MOTA, R.A.; SÁ, M.E.P.; OLIVEIRA, A.A.F. et al. Mastite bovina por *Prototheca zopfii* no estado de Pernambuco, Brasil. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM MASTITE, 3, 1999, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP, p.162, 1999.

NADER FILHO, A. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.5, n.2, p.53-56, 1985.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7ed. Washinton, D.C.: 2001. 381p.

NEVES, M.F.; CÔNSOLI, M.A. **Estratégias para o leite no Brasil**. Editora Atlas, 2006, p.304.

NOVO, D.; PERLMUTTER, N.G.; HUNT, R.H.; SHAPIRO, H.M. Accurate flow cytometric membrane potential measurement in bacteria using diethylcarbocyanine and a ratiometric technique. **Cytometry**, v.35, p.55-63, 1999.

NUNES, J.F.; COMBARNOUS, Y. Utilização da água de côco e suas frações ativas como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. In: SIMPÓSIO DE BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS, 1995, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: UECE, p.53-64, 1995.

O'BRIEN, P.J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, v.129, p.113-139, 2000.

OLIVEIRA, D.L.; PUGINE, S.M.P.; FERREIRA, M.S.L.; LINS, P.G.; COSTA, E.J.X.; DE MELO, M.P. Influence of indole-3-acetic acid on antioxidant levels and enzyme activities of glucose metabolism in rat liver. **Cell Biochemistry and Function**, v.25, p.195-201, 2007.

OSUMI, T.; KISHIMOTO Y.; KANO, R.; MARUYAMA, H.; ONOZAKI, M.; MAKIMURA, K.; ITO, T.; MATSUBARA, K.; HASEGAWA, A. *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. **Veterinary Microbiology**, v.131, p.419-423, 2008.

PAAPE, M.J.; CAPUCO, A.V. Cellular defence mechanisms in the udder and lactation of goats. **Journal of Animal Science**, v.75, p. 556–565, 1997.

PACKER, L. Oxidants, antioxidants, nutrients and the athlete. **Journal of Sports Sciences**, v.15, p.353-363, 1997.

PAGLIA , D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erutrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.276, p.368-374, 1967.

PALES, A.P.; SANTOS, K.J.G.; FIGUEIRAS, E.A.; MELO, C.S. A importância da contagem de células somáticas e contagem bacteriana total para a melhoria da qualidade do leite no Brasil. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v.1, p.162-173, 2005.

PANKEY, J.M.; DRECHSLER, P.A. Evolution of udder hygiene: premilking teat sanitation. **Veterinary Clinical North American**, v.9, p.519-530, 1993.

PELCZAR, M.S.; REID, R.D.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, v.1, 1981.

PERMPANICH, P.; KOWOLIK, M.J.; GALLI, D.M. Resistance of fluorescence-labeled *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* strains to phagocytosis and killing by human neutrophils. **Cellular Microbiology**, v.8, p.72-84, 2006.

PHILPOT, W.N. Economics of mastitis control. Symposium on mastitis. **Veterinary Clinics of North America: Large Animal Practice**, v.6, p.233-245, 1984.

PHAIR, J.; WILLIAMS, J.; BASSARIS, H.; ZEISS, C.; MORLOCK, B. Phagocytosis and algicidal activity of human polymorphonuclear neutrophils against *Prototheca wickerhamii*. **Journal of Infectious Diseases**, v.144, p.72-77, 1981.

PICK, E.; MIZEL, D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **Journal of Immunological Methods**, v.46, p.211-226, 1981.

PORE, R.S. *Prototheca* taxonomy. **Mycopathologia**, v.90, p.129–39, 1985.

PORE, R.S.; BARNETT, E.A.; BARNES, JR, W.C.; WALKER, J.D. *Prototheca* ecology. **Mycopathologia**, v.81, p.49-62, 1983.

PORE, R.S.; SHAHAN, T.A. *Prototheca zopffi* natural, transient occurrence in pigs and rats. **Mycopathologia**, v.101, p.85-88. 1988.

POULSEN, H.E.; JENSEN, B.R.; WEIMANN, A.; JENSEN, S.A.; SORENSEN, M.; LOFT, S. Antioxidants, DNA damage and gene expression. **Free Radical Research**, v.33, p.833-839, 2000.

PRATA, L.F. Leite UHT: solução ou problema? Uma análise da situação. **Higiene Alimentar**, v.12, p.10–15, 1998.

PRUSTY, R.; GRISAFI, P.; FINK, G.R. The plant hormone indole acetic acid induces invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, p.4153–4157, 2004.

PONCHIO, L.A.; GOMES, A.L.; PAZ, E. Perspectivas de consumo de leite no Brasil. In: **XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural**. Ribeirão Preto, 2005.

PUGINE, S.M.P. **Efeito do sistema ácido indol-3-acético/peroxidase de raiz forte sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus***. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

PUGINE, S.M.P.; BRITO, P.P.; ALBA-LOUREIRO, T.C.; COSTA, E.J.X.; CURTI, R. DE MELO, M.P. Effect of indole-3-acetic acid administration by gavage and by subcutaneous injection on rat leukocytes. **Cell Biochemistry and Function**, v.25, p.723-730, 2007.

RAMAMURTHY, M.S.; USSUF, K.K.; NAIR, P.M.; THOMAS, P. Lignin biosynthesis during wound healing of potato tubers in response to gamma irradiation. **Postharvest Biology and Technology**, v.18, p.267-272, 2000.

RAPUNTEAN, S.; RAPUNTEAN, G.; FIT, N.; CUC, C.; NADAS, G. Morphological and cultural characterization of some strains of unicellular algae of the genus *Prototheca* sampled from mastitic cow milk. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj**, v.37, p.31-40, 2009.

REIS, G.L.; ALVES, A.A.; LANA, A.M.Q.; COELHO, S.G.; SOUZA, M.R.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; PENNA, C.F.A.M.; MENDES, E.D.M. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físicoquímica e a contagem de células somáticas. **Revista Ciência Rural**, v.37, p.1134-1138, 2007.

RIBEIRO, A.R. **Estudo da mastite bovina causada por microrganismos ambientais: influência do manejo e higiene, sazonalidade e qualidade microbiológica da água**. 2001. 138 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, L.A.; AITA, M.F.; BALBINOTTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J.F.; SCHRAMM, R.C.; MARTINS, P.R.; BARBOSA, R.S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.9, n.3, p.287-290, 2003.

RODRIGUES, A.P. **Oxidação de compostos β -dicarbonílicos por peroxidase**. 2007. 141 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

RODRIGUEZ, T.; ALTIERI, A.; CHATENOU, L.; GALLUS, S.; BOSETTI, C.; NEGRI, E.; FRANCESCHI, S.; LEVI, F.; TALAMINI, R.; LA VECCHIA, C. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. **Oral Oncology**, v.40, p.207-213, 2004.

ROESLER, U.; HENSEL, A. Longitudinal analysis of *Prototheca zopfii*-specific immune responses: correlation with disease progression and carriage in dairy cows. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1181-1186, 2003.

ROESLER, U.; MÖLLER, A.; HENSEL, A.; BAUMANN, D.; TRUYEN, U. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1419–1425, 2006.

ROESLER, U.; SCHOLZ, H.; HENSEL, A. Emended phenotypic characterization of *Prototheca zopfii*: a proposal for three biotypes and standards for their identification. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53, pp. 1195-1199, 2003.

ROESLER, U.; SCHOLZ, H.; HENSEL, A. Immunodiagnostic identification of dairy cows infected with *Prototheca zopfii* at various clinical stages and discrimination between infected and uninfected cows. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.539-543, 2001.

ROLCIK, J.; RECINSKA, J.; BARTAK, P.; STRNAD, M.; PRINSEN, E. Purification of 3-indolylacetic acid by solid phase extraction. **Journal of Separation Science**, v.28, p.1370-1374, 2005.

ROSA, F.A.F. **Síntese e avaliação da atividade reguladora de crescimento vegetal de novos compostos indólicos derivados do safrol e relacionados ao ácido indol-3-acético**. 2002. 161f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

ROVER JÚNIOR, L.; HOEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v.24, p.112-119, 2001.

RUSS, J.C. **The Image Processing Handbook**. CRC Press, 1998.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach**. American Society for Microbiology, Washington DC, 1994.

SANCHES, S.M.; MARTINS, R.; CORDEIRO, P.J.M.; VAZ, L.A.A.; VIEIRA, E.M. Validação do método para a determinação do ácido 3-indolacético em água de rios por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ambi-Água - Taubaté**, v.4, p.81-92, 2009.

SANTOS, M.V. Efeitos da mastite sobre a qualidade do leite e dos derivados lácteos. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa, p.179-188, 2002.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Microrganismos patogênicos transmitidos pelo leite. In: **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. São Paulo, p. 268-277, 2007.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experimental and observations leading to developing of California mastitis test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.130, p.199-204, 1957.

SCHMALRECK, A.F., TRANKLE, P., VANCA, E.; BLASCHKE-HELLMESSEN, R. Differenzierung und Charakterisierung von humanpathogenen Hefen (*Candida albicans*, *Exophiala dermatidis*) und tierpathogenen Algen (*Prototheca* spp.) mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) im Vergleich zu konventionellen Methoden. **Mycoses**, v.41, p.71–77, 1998.

SEGAL, A.W., ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends in Biochemical Sciences**, v.18, 43–47, 1993.

SHAHAN, T.A.; PORE, R.S. *In Vitro* Susceptibility of *Prototheca* spp. to Gentamicin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p.2434-2435, 1991.

SHEPHERD, H. Milking machine testing and mastitis. In: WORLD BUIATRICS MASTITIS WORKSHOP & SEMINARS, 19., 1996, Edinburgh. **Proceedings...** p.16-18.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v.215, p.213-219, 1993.

SMITH, K.L.; TODHUNTER, D.A.; SCHOENBERGER, P.S. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. **Journal of Dairy Science**, v.68, n.6, p.1531-53, 1985.

SORDILLO, L.M; NICKERSON, S.C. Morphologic chnages in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, p.1112-1120, 1988.

SORDILLO, L.M; SHAFER-WEAVER, K.; DeROSA, D. Immunobiology of the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.1851-1865, 1997.

SRIVASTAVA, O.P.; VAN HUUSTEE, R.B. An inter-relationship among peroxidase, IAA oxidase and polyphenoloxidase from plant cells. **Canadian Journal of Botany**, v. 55, p. 2630-2636, 1977.

STEFFENSEN, J.F.; BUSHNELL, P.G.; SCHURMANN H. Oxygen consumption in four species of teleosts from Greenland: no evidence of metabolic cold adaptation. **Polar Biology**, v.14, p. 49–54, 1994.

SUNG, W.S.; LEE, D.G. In vitro antimicrobial activity and the mode of action of indole-3-carbinol against human pathogenic microorganisms. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p.1865–1869, 2007.

TABOGA, S.R. Microscopia. In: RECCO-PIMENTEL, S.M.; CARVALHO, H.F. **A célula 2001**, cap.2, p.06-14, 2001.

TAFAZOLI, S.; O'BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cytotoxic effects of indole-3-acetic acid derivative radicals. **Chemical Research in Toxicology**, v.17, p.1350-1355, 2004.

THIERS, F.O.; COSTA, E.O.; GARINO, I.R., F.; BENITES, N.R. Conteúdo celular do leite de bovinos em diferentes fases da lactação. In: ENCONTRO DE PESQUISADORES EM

MASTITES, 3, Botucatu, 1999. **Anais...** Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, p.145, 1999.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária - Uma Introdução**. Editora Roca, 6ª ed., São Paulo, 2002, 531p.

TONIOLLI, R.; BUSSÈRE J.; COUROT, M.; MAGISTRINI, M.; COMBASNOUS, Y. Effect of indole-3-acetic acid (plant auxin) on the preservation at 15°C of boar semen for artificial insemination. **Reproduction Nutrition Development**, v.36, p.503-511, 1996.

TORTORANO, A.M.; PRIGITANO, A.; DHO, G.; PICCININI, R.; DAPRA, V.; VIVIANI, M.A. *In vitro* activity of conventional antifungal drugs and natural essences against the yeast-like alga *Prototheca*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, p.1312–1314, 2008.

TOZZETTI, D.S.; BATAIER, M.B.N.; ALMEIDA, L.R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária**, ISSN: 1679-7353, 2008.

TRAVACIO, M.; Llesuy, S. Antioxidant enzymes and their modifications under oxidative stress conditions. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v.48, p.9-13, 1996.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. UFSM, 1997. 151p.

TUSSELL, J.M.; ARTIGAS F.; SUNOL C.; MARTINEZ E.; GULPI E. Comparison of high-performance liquid-chromatography and gas chromatography massspectrometry for the analysis of indole-3 acetic acid in brain-tissue. **Journal of Chromatography**, v.306, p.338-344, 1984.

URSO, M.L; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. **Toxicology**, v.189, p.41-54, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZACOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p.1-40, 2006.

VALLE, C.R. **Estudo da influência da suplementação de vitamina E nas atividades funcionais dos neutrófilos do leite de bovinos**. 2005. 82f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato alcoólico de própolis. **Revista Ciência Rural**, v.34, p.159-163, 2004.

VAZ, A.; CARNEIRO, A.; WOLFF, C.; DICK, W.; LUCIANO, A. Mastite bovina por *Prototheca* spp. em Santa Catarina: relato de caso. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.4, p.72-75, 2005.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v.65, p.249-259, 2004.

VENEZIO, F.R., LAVOO, E.; WILLIAMS, J.E.; ZEISS, C.R.; CARO, W.A.; MANGKORNKANOK-MARK, M.; PHAIR, J.P. Progressive cutaneous protothecosis. **American Journal of Clinical Pathology**, v.77, p.485–493, 1982.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level**. 2nd ed. John Wiley & Sons: New York, 2005, 1264p.

WACHOWICZ, C.M.; CARVALHO, R.I.N. **Fisiologia vegetal: produção e pós-colheita**. Curitiba: Editora Universitária Champagnat, 2002, 424p.

WALSH, S.V.; JOHNSON, R.A.; TAHAN, S.R. Protothecosis: an unusual cause of chronic subcutaneous and soft tissue infection. **American Journal of Dermatopathology**, v.20, p.379- 382, 1998.

WARDMAN, P. Indole-3-acetic acids and horseradish peroxidase: a new prodrug/enzyme combination for targeted cancer therapy. **Current pharmaceutical design**, v.8, p.1363-1374, 2002.

WATTS, J.L. Etiological agent of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.16, p.41-66, 1988.

WINTERBOURN, C.C.; GARCIA, R.; SEGAL, A.W. Production of the superoxide adduct of myeloperoxidase (compound III) by stimulated neutrophils, and its reactivity with H₂O₂ and chloride. **Biochemical Journal**, v.228, p.583-592, 1985.

WEBER, L.; PETERHANS, E.; WYLER, R. The chemiluminescent response of bovine polymorphonuclear leucocytes isolated from milk and blood. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.4, p.397-412, 1983.

WEISSBACH, H.; KING, W.; SJOERDSMA, A.; UDENFRIEND, S. Formation of indole-3-acetic acid and tryptamine in animals: a method for estimation of indole-3-acetic acid in tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v.234, p.81-86, 1959.

WHITTEMORE, C.T. Characteristic of lactation yield. In: **Lactation of the dairy cow**. Longman, London and New York, 1980.

XAVIER, C.A.C.; LEITE, A.C.R.M.; GIRÃO, V.C.C.; FÉLIX V.S.; SANTOS, M.G.L.; AZEVEDO, T.C.G.; SILVA, F.R.F.; GUERRA, C.M.P.; ROCHA, H.A.O.; LEITE, E.L. Atividade antiinflamatória do Fucoïdam do *Fucus vesiculosus* em um modelo experimental de artrite. In: 57ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 2005, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza-CE, 2005.

XU, G.; MCLEOD, H.L. Strategies for Enzyme/Prodrug Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v.7, p.3314- 3324, 2001.

YAMADA, H.; YAMAZAKI, I. Proton balance in conversions between five oxidation-reduction states of horseradish peroxidase. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.165, p.728-738, 1974.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v.74, p.139-162, 1994.