CAMILA GOULART CARVALHO SIMÕES

**Expressão imunoistoquímica de p53 e bcl-2 em
casos de leucose enzoótica bovina**

**São Paulo
2007**

CAMILA GOULART CARVALHO SIMÕES

**Expressão imunoistoquímica de p53 e bcl-2 em
casos de leucose enzoótica bovina**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Patologia
Experimental e Comparada da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Departamento:
Patologia

Área de Concentração:
Patologia Experimental e Comparada

Orientador:
Prof. Dr. Paulo César Maiorka

São Paulo

2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1913
FMVZ

Cavalcante, Carolina Zaghi

Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismismo e a relação com a pressão arterial sistêmica / Carolina Zaghi Cavalcante. – São Paulo: C. Z. Cavalcante, 2007.

105 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Márcia Mery Kogika.

1. Cães. 2. Hiperadrenocorticismismo. 3. Proteinúria. 4. Eletroforese.
5. Albuminúria. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Expressão imunoistoquímica de p53 e bcl2 em casos de leucose enzoótica bovina", protocolado sob o nº1234/2007, utilizando 22 (vinte e dois) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Maiorka, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Immunohistochemical expression of p53 and bcl2 in enzootic bovine leukosis cases", protocol number 1234/2007, utilizing 22 (twenty two) bovines, under the responsibility Prof. Dr. Paulo César Maioka, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 06 de novembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SIMÕES, Camila Goulart Carvalho

Título: Expressão imunoistoquímica de p53 e bcl-2 em casos de leucose enzoótica bovina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Cauã, por ser em um só tempo,
a minha grande paixão e o meu grande
orgulho;

À minha mãe, Maria Célia, por todo carinho
e pelo apoio em todas as etapas desta
trajetória.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo César Maiorka, pelos conhecimentos transmitidos, apoio, sabedoria, amizade e respeito.

À Prof. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, pela disponibilização de materiais utilizados, assim como toda sua colaboração.

Ao Prof. Dr. José Luís Guerra, pelo incentivo, confiança, amizade e por todos os ensinamentos transmitidos durante nosso convívio.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (RS), pela doação de amostras, imprescindíveis para realização do trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Histopatologia do VPT, Luciano e Cláudio, e aos pós – graduandos, Caio Rodrigues, Kalan e Fernando, pela confecção das lâminas estudadas.

Às secretárias do VPT, da pós-graduação da FMVZ e da pós-graduação do VPT Cláudia, Cristina, Cláudia, Deise, Joana e Sílvia, pelo auxílio sempre que preciso.

A todas as funcionárias da biblioteca da FMVZ, pelo auxílio sempre que necessário.

Ao meu marido, Kléber, pela compreensão nos momentos difíceis.

Aos colegas do VPT que contribuíram com ensinamentos para realização dos experimentos: Bruno, Heidge, Lucas, Tereza, Márcia, Mirela, e Patrícia.

Às funcionárias do Departamento, Cyntia e Marguiti, pela simpatia, amizade e auxílio durante todo esse período.

Às minhas amigas, Andreza e Vanessa, que mesmo de longe sempre torceram por mim.

Às pós-graduandas, Camila Moreira e Andréia Latorre, pela ajuda em algumas etapas deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro (projeto nº 2005-60606-3) que possibilitou a efetivação desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos os colegas de pós-graduação com quais compartilhei novas experiências e conhecimentos.

RESUMO

SIMÕES, C. G. C. **Expressão imunoistoquímica de p53 e bcl-2 em casos de leucose enzoótica bovina [Immunohistochemical expression of p53 and bcl-2 in enzootic bovine leukosis cases]**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A Leucose Enzoótica Bovina é uma doença crônica de ocorrência mundial que acomete bovinos. Seu agente etiológico é um retrovírus do mesmo grupo dos que causam a leucemia linfocítica crônica e a AIDS, importantes doenças que acometem humanos. Os retrovírus são vírus que se integram ao DNA do hospedeiro e desta forma são potencialmente mutagênicos. Os bovinos infectados podem desenvolver uma linfocitose persistente e/ou linfoma. A gênese das neoplasias está nas mutações de classes de genes como os proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes de reparo do DNA e genes que controlam a apoptose. O gene p53 acumula algumas funções como de parada do ciclo celular, estímulo ao reparo do DNA ou indução da célula a apoptose. O gene bcl-2 é conhecidamente um gene que regula a apoptose. A interferência no processo de apoptose através de mutações provocadas pelos retrovírus nos genes p53 e bcl-2 é um dos mecanismos carcinogênicos associados a LEB. As mutações no gene p53 acabam promovendo o aumento de sua meia vida e em bcl-2 o aumento em sua expressão. Devido a essas alterações o aumento na expressão do gene bcl-2 e o aumento da meia vida da p53 podem ser avaliadas pela técnica de imunoistoquímica. O presente trabalho avaliou as proteínas p53 e bcl-2 em amostras de bovinos infectados pelo VLB através da técnica de imunoistoquímica. Foram pré-definidos escores de imunomarcção em amostras de animais não infectados. Os escores apresentados pelos animais infectados pelo VLB foram significativamente maiores que os animais do grupo controle. Os valores percentuais de imunomarcção apresentados para bcl-2 foram de $50,26 \pm 12,25$ do grupo afetado contra $10,86 \pm 3,30$ do grupo controle. Para p53 somente o grupo afetado apresentou imunomarcção, ficando em zero a imunomarcção do grupo controle. O valor percentual médio do grupo afetado foi de $55,95 \pm 7,07$. A diferença significativa entre os percentuais dos grupos controle e

afetado confirma que os genes p53 e bcl-2 podem estar envolvidos no processo de linfomagenese da LEB.

Palavras-chave: Leucose. p53. bcl-2. Linfomagenese. Apoptose.

ABSTRACT

SIMÕES, C. G. C. **Immunohistochemical expression of p53 and bcl-2 in enzootic bovine leukosis cases [Expressão imunoistoquímica de p53 e bcl-2 em casos de leucose enzoótica bovina]**. 2007. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The Enzootic Bovine Leukosis (EBL) is a chronic disease with mundial occurrence in bovines. Its etiologic agent is a retrovirus of the same group that promotes the chronic lymphocytic leukemia and HIV, that wich are important diseases in humans. The retrovirus integrates into the host DNA and thus they are potential mutagenic. The infected bovines can develop a persistent lymphocytosis and/or lymphoma. The neoplasm genesis is associated with genes mutation like the protooncogenes, tumor suppressor, DNA repair and apoptosis control. The p53 gene has some functions how cell cycle arrest, DNA repair stimulus or apoptosis induced. The interference in the apoptosis process through mutations stimulates about the retrovirus in the p53 and bcl-2 genes are the carcinogenic mechanisms associated to EBL. The mutations in the p53 gene promote the increase in its half life and increase of bcl-2 expression. Due this alterations the increase of bcl-2 gene expression and p53 half-life can be evaluate by immunohistochemistry. This work evaluated the bcl-2 and p53 proteins in EBL infected bovines tissue samples by immunohistochemistry. We determined scores of immunomarked in non-infected animal's samples. The scores showed by the EBL infected animals were significantly higher than in control group. The infected bovines showed $50.26 \pm 12.25\%$ of positive cells to bcl-2 while the control group showed $10.86 \pm 3.3\%$. Only the infected animals presented reactivity against p53, whereas the control group no showed reaction. These results confirm that the p53 and bcl-2 genes can be involved in a process of EBL leukemogenesis.

Key-words: Leukosis. p53. bcl-2. Leukemogenesis. Apoptosis.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A busca por mecanismos que expliquem a patogênese das doenças e seu desenvolvimento vem sendo alvo de inúmeras pesquisas. Assim, demonstrar melhores e mais eficientes métodos de diagnóstico e tratamento, bem como estabelecer medidas profiláticas e de controle. O presente trabalho busca investigar o envolvimento dos genes p53 e bcl-2 no processo carcinogênico da Leucose Enzoótica Bovina (LEB). Ambos os genes estão envolvidos nos mecanismos de apoptose (TOMADAKI; SCORILAS, 2006). A apoptose é um dos principais meios regulatórios das diversas populações celulares e uma possível alteração neste processo poderia desencadear uma quebra na homeostase populacional das células e desta forma ser uma possível responsável no desenvolvimento da neoplasia. A LEB é uma doença conhecida de etiologia viral cujo retrovírus pertence ao mesmo subgrupo daquele que provoca a leucemia de linfócitos T em humanos (REYES; COCKERELL, 1998). Apesar de apresentar distribuição mundial, e vários países já terem conseguido o controle e erradicação da doença, os mecanismos leucemogênicos vinculados a esta doença ainda não estão totalmente elucidados.

Para realização do presente trabalho foram analisadas amostras de tecidos de bovinos com LEB, sorologicamente comprovados. Os departamentos de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) colaboraram com o trabalho cedendo as amostras de tecido

analisadas. O Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) colaborou processando e realizando todas as técnicas desenvolvidas na pesquisa.

Revisão de literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

O primeiro registro no mundo de uma doença chamada “leucose” data de 1871 e foi descrita na Alemanha por Leisering (GILLET et al., 2007). Nesta época as alterações observadas foram nódulos amarelados no baço, que também se encontrava aumentado (WILLIEMS et al., 2000). Os primeiros relatos de casos no Brasil foram descritos em 1943 por Rangel e Machado (1943 apud DEL FAVA; PITUCO, 2004, p. 2) e em 1959 por Santos et al. e Merckt et al. A difusão do vírus pelo mundo se deu através da introdução de animais europeus infectados em rebanhos de países onde não haviam registros da doença (LEITE; LOBATO; CAMARGOS, 2004; TOSTES, 2005). No Brasil os últimos dados sobre prevalência da doença em nove estados brasileiros mostra que o Rio de Janeiro, Pará e São Paulo têm os maiores índices percentuais com 49,8%, 54,3% e 46,4% respectivamente, enquanto os estados do Acre, Alagoas, Paraíba, Rio Grande do Sul têm os menores índices com 9,7%, 9,6%, 8,3% e 9,2% respectivamente. O número de animais testados em cada estado e o período em que foram obtidos foram bem diferentes. O número de animais variou de 317 em Minas Gerais a 39.799 no Rio Grande Do Sul. O ano em que foram feitos os relatos variaram de 1979 até datas mais recentes como o ano de 1999. Os índices encontrados vêm confirmar a presença da Leucose Enzoótica Bovina já a bastante tempo em praticamente todo o território brasileiro, o que a torna uma doença importante pelos prejuízos que provoca (BARROS, 2007).

2.1 Aspectos Gerais da Doença

A leucose bovina é uma doença neoplásica crônica e tem quatro apresentações, sendo que apenas a forma de linfoma multicêntrico do adulto (esta chamada de Leucose Enzoótica Bovina - LEB) já está associada a um agente etiológico. Esta forma de apresentação ocorre predominantemente em bovinos com mais de dois anos, com maior incidência entre os cinco e sete anos de idade. As outras formas são esporádicas e se apresentam na forma multicêntrica juvenil, cutânea e tímica e ainda não estão associadas a um agente (BARROS, 2007). A LEB é causada por um deltaretrovírus da família *Retroviridae*, chamado vírus da leucemia bovina (VLB). Três estágios característicos podem ser descritos na LEB: animais sorologicamente positivos, porém sem linfocitose persistente (LP); animais sorologicamente positivos e com LP e ainda animais sorologicamente positivos com linfoma multicêntrico (KABEYA; OHASHI; ONUMA, 2001). Alguns pesquisadores classificam apenas duas formas de apresentação sendo elas a LP e o linfossarcoma, podendo estas também ocorrerem simultaneamente (NUOTIO et al., 2003). Cerca de 30 a 70% dos animais infectados apresentam LP (DEL FAVA; PITUCO, 2004) e apenas 1 a 5% dos bovinos infectados desenvolvem o linfoma multicêntrico adulto.

Grande percentual dos animais infectados permanece sem sinais clínicos e se tornam reservatórios e transmissores do vírus (LEUZI; ALFIERI; ALFIERI, 2001; BARROS, 2007). Embora as respostas imunes humoral e celular sejam induzidas pelo VLB, alguns estudos têm mostrado que a resposta imune celular contribui de maneira importante com a supressão da replicação do VLB e desta forma atrasando a

progressão da doença (KABEYA; OHASHI; ONUMA, 2001). O sinal clínico característico da doença é o aumento dos linfonodos, principalmente, pré-escapulares e pré-crurais, conforme mostram as figuras 1 e 2.

Fonte: www.asukafrica.com

Figura 1 - Linfonodos pré-escapulares aumentados em consequência da LEB.

Fonte: www.asukafrica.com

Figura 2 - Linfonodos pré-crurais aumentados em consequência da LEB.

Outros sinais ocorrem dependendo do local de aparecimento dos tumores e dos órgãos afetados, como por exemplo, exoftalmia, dispnéia, edema subcutâneo da região ventral, ingurgitamento jugular e sinais neurológicos (BARROS, 2007). O sistema imune também pode ficar comprometido, predispondo os animais a infecções secundárias, levando-os desta forma ao descarte antes da apresentação dos sinais clínicos da LEB (LEUZI; ALFIERI; ALFIERI, 2001). A apresentação destes sinais está sempre associada a perdas econômicas seja por diminuição na produção, reprodução, gastos extras com serviços veterinários ou por restrições comerciais com países livres do VLB (TOSTES, 2005; ACAITE et al., 2007). A transmissão do vírus ocorre tanto pela forma vertical quanto horizontal. A transmissão horizontal é a mais importante e se dá principalmente por contato direto dos animais com secreções e excreções de animais contaminados e também por meio de instrumentos contaminados utilizados em descornas,

procedimentos cirúrgicos, vacinações, injeções e tatuagens (DEL FAVA; PITUCO, 2004; TOSTES, 2005; ACAITE et al., 2007). Os métodos sorológicos são os principais meios de diagnóstico da LEB, tais como o teste de imunodifusão em ágar-gel (IDAG) e ELISA (REBHUN; GUARD, 2000; NUOTIO et al., 2003). Alguns autores demonstraram que esses testes não são suficientemente sensíveis para detectar todos os animais infectados com a LEB (ACAITE et al., 2007). O resultado positivo em bezerros de até sete meses pode se dar ou por infecção intrauterina ou por transmissão de anticorpos do colostro à primeira mamada, embora o mais comum seja encontrar animais soropositivos com mais de dois anos de idade. Animais com LP apresentam aumento do número de linfócitos no leucograma que persistem por pelo menos três meses (BLOOD et al., 1991), embora esta alteração aconteça em apenas 30% dos animais infectados (LEUZI; ALFIERI; ALFIERI, 2001). Até o momento não existem vacinas ou tratamentos eficientes, sendo portanto medidas profiláticas e de controle para erradicação, como utilização de instrumentos de uso veterinário estéreis nos animais, eliminação de animais soropositivos e segregação de animais infectados, as principais medidas a serem tomadas (LEITE; LOBATO; CAMARGOS, 2004).

2.2 Os Retrovírus

Os retrovírus são responsáveis por inúmeras doenças na Medicina Veterinária como a Leucose e Sarcoma Aviário, Leucose Enzoótica Bovina, Leucemia Felina, Imunodeficiência Felina, Maedi/Visna, artrite e encefalite caprina, anemia infecciosa eqüina, além de uma espécie desta família ser também o causador de importantes

doenças da espécie humana como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e a Leucemia de linfocítica de células T. Os vários gêneros que compõem a família *Retroviridae* são: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus* (MURPHY et al., 1999). A classificação dos retrovírus até hoje busca aspectos diferenciais para classificar alguns vírus da família. Os primeiros critérios foram a espécie hospedeira, a morfologia do vírion e a morfogênese e hoje se utiliza relações entre as seqüências de nucleotídeos contidas no genoma viral (COFFIN; HUGHES; VARMUS, 1997).

Os vírions dos retrovírus são envelopados, têm 80-100nm de diâmetro e possuem estrutura única em três camadas. O envelope envolve o capsídeo que tem forma icosaédrica. Na região interna do capsídeo encontramos o complexo núcleoprotéico-genômico. O genoma destes vírus é diplóide e constituído de duas moléculas senso-positivas de RNA fita simples, onde cada um possui os genes *gag*, que codifica proteínas para o núcleo, gene *pol*, que codifica para a transcriptase reversa e o gene *env*, que codifica para glicoproteínas do envelope. Retrovírus defeituosos podem não conter algum destes genes (KUFELT et al., 2003). Seu genoma tem algumas características únicas que são: é diplóide sendo formado por duas fitas senso-positiva de RNA simples; único vírus RNA que é sintetizado e processado pela maquinaria de processamento do RNA mensageiro da célula do hospedeiro; único genoma associado com um RNA específico de transferência cuja função é preparar a replicação viral; é o único genoma RNA de fita simples senso-positivo que não serve como RNA mensageiro após a infecção; e é o único genoma que codifica uma transcriptase reversa (COFFIN; HUGHES; VARMUS, 1997 e MURPHY et al., 1999). Os retrovírus podem inserir uma cópia completa do DNA do genoma (conhecida como provírus)

dentro do DNA de linhagens germinativas de células do hospedeiro e assim se propagar para todas as células de todos os indivíduos de uma espécie. Estes provírus geralmente se submetem aos mecanismos regulatórios celulares do hospedeiro ficando assim silenciosos (GILLET et al., 2007). Estes retrovírus são chamados de endógenos e dificilmente desencadeiam doenças. Os retrovírus que provocam doenças tipicamente como um agente infeccioso são chamados exógenos. Estes geralmente são oncogênicos e mostram predileção por se instalarem em determinadas células alvo (BARON, 1996; GILLET et al., 2007). Ainda existem alguns retrovírus exógenos classificados como rapidamente oncogênicos que possuem um gene a mais, um *v-onc*, responsável pela rápida transformação maligna da célula infectada. Estes genes rapidamente oncogênicos geralmente necessitam de um retrovírus auxiliar não defeituoso para sua replicação (MURPHY et al., 1999).

2.2.1 O vírus da Leucemia Bovina

O vírus da leucemia bovina (VLB), causador da Leucose Enzoótica Bovina (LEB), ainda causa enormes prejuízos à pecuária mundial (ACAITE et al., 2007). Ele é um deltaretrovírus linfotrópico lentamente oncogênico que acomete predominantemente linfócitos B embora possa persistir em outras células como na linhagem de monócitos/macrófagos. Ao contrário dos vírus rapidamente oncogênicos, os lentamente oncogênicos não possuem em seu genoma os *v-oncs*, mas podem induzir com pouca eficiência após longo período de incubação linfomas de células B e T além de

leucemias mielóides (MURPHY et al., 1999). O VLB, além de possuir os genes *gag*, *pol* e *env* possui também uma região X, também observada em outros deltaretrovírus. A região X está localizada entre o envelope e a extremidade 3' da repetição terminal longa, chamada de LTR (*“long terminal repeat”*). Nesta região estão localizados os genes R3, G4, Rex e Tax sendo esta última suspeita de estar fortemente envolvida no processo carcinogênico (GILLET et al., 2007). A figura 3 ilustra a estrutura de um provírus do VLB, com seus genes, RNAs transcritos e proteínas virais codificadas.

Fonte: Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, v. 4, n. 18, p. 4, 2007.

Figura 3 - Estrutura do provírus do VLB: Genes, RNA transcritos e proteínas virais.

É um retrovírus de replicação competente. A resistência que alguns bovinos apresentam ao VLB estão provavelmente relacionados com as características genéticas do hospedeiro ligadas ao Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP - em bovinos chamada de BoLA – Bovine Leukocytes Antigens). Bovinos que possuem em seu genoma BoLA-Aw7 apresentam resistência enquanto os que apresentam BoLA-Aw12 se mostram suscetíveis ao desenvolvimento da LEB. O alelos BoLA-DRB parecem ser os que interferem mais fortemente na suscetibilidade ou resistência ao VLB (TIZARD, 2004).

A apresentação de semelhanças na organização genética e na presença de sistemas complexos para regulação da expressão gênica faz com que o VLB e o vírus da leucemia de células T de humanos (HTLV) sejam membros de um único subgrupo de retrovírus (VERNAU et al., 1997). Uma diferença marcante do VLB, que o faz único entre os outros membros deste subgrupo, é que ele infecta e desregula linfócitos B enquanto os outros vírus infectam linfócitos T (STONE; NORTON; DAVIS, 2000). Ambos os vírus também estão associados com desregulação não-neoplásica de linfócitos, neoplasias linfóides e/ou mielopatias progressivas (TAJIMA; IKAWA; AIDA, 1998; STONE; NORTON; DAVIS, 2000). Apesar de existir uma relação próxima entre o VLB e o HTLV parece ser improvável a infecção do VLB em humanos, embora esta hipótese não possa ser formalmente excluída. Alguns pesquisadores têm descrito através de estudos epidemiológicos a infectividade e potencial oncogênico do VLB também em humanos (JOHNSON; GRISWOLD, 1996; LEE et al., 2005). De maneira similar aos bovinos infectados pelo VLB, apenas 2 a 3 % de pessoas infectadas com o

HTLV-1 desenvolvem neoplasias linfóides ou a Mielopatia associada ao HTLV (GILLET et al., 2007).

2.2.2 Mecanismos Carcinogênicos Associados ao vírus da Leucemia Bovina

A desordem proliferativa provocada pelo VLB representa uma violação na homeostase celular. Os tumores da LEB são monoclonais e oriundos de células B (YIN, et al., 2003; IKEDA et al., 2004). Pesquisas têm evidenciado que a infecção e o desenvolvimento do câncer relacionado com o VLB é um processo em múltiplas etapas. Algumas dessas etapas estariam envolvidas com a diferenciação de linfócitos B de onde resultaria em um fenótipo tumoral comum e uma predominante morfologia celular típica (VERNAU et al., 1997). Embora isto tenha sido proposto, como a patogênese dos tumores induzidos pelo VLB não exige uma única célula, podemos observar uma diversidade histológica e fenotípica na LEB (IKEDA et al., 2004). O desbalanço nos processos de sobrevivência e morte celular que o vírus desencadeia são fundamentais para o desenvolvimento da LEB e a explicação que leva ao descontrole destes processos podem ser fundamentais para um melhor entendimento sobre o desenvolvimento e progressão da doença (REYES; COCKERELL, 1998). Alguns pesquisadores têm sugerido que genes que participam deste processo homeostático de sobrevivência e morte celular, como os genes p53 e a família bcl-2 participam do processo oncogênico, juntamente com a proteína viral Tax (TAJIMA et al., 1998; TAKAHASHI et al., 2005). A proteína viral Tax é importante no processo de replicação viral e ativação da transcrição. A transativação promovida pela Tax requer interação com fatores de

transcrição nucleares da célula do hospedeiro. As regiões de abertura para leitura de TAX se apresentam intactas durante o processo de leucemogênese, sugerindo um papel importante para este gene neste processo. Alguns provírus já demonstraram deleções em regiões importantes para expressão de Tax, sendo este um indício que põe em dúvida a importância deste gene na leucemogênese. Outras vias de expressão para Tax são sugeridas, porém o que é claro é que um Tax íntegro é essencial para infecções *in vivo*. Alguns estudos também mostraram sua interferência no processo de apoptose. É atribuído também a Tax um papel similar a de um oncogene embora este não possa ser estritamente classificado como tal por não ter um homólogo celular (DEES et al., 1996). Os membros da família bcl-2 estão localizados estrategicamente na membrana mitocondrial externa, envelope nuclear e retículo endoplasmático (AKGUL, MOULDING; EDWARDS, 2004). Sua atuação regulando a saída de citocromo c das mitocôndrias como uma “proteína estaleiro” seqüestrando o fator ativador de proteases pró-apoptótico (*Apaf-1*) é um dos mecanismos reguladores atribuído à proteína bcl-2 (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2007). A família de bcl-2 possui membros antiapoptóticos (bcl-2, bcl-xL) e pró-apoptóticos (bax, bad, bid, bcl-xS). Os membros desta família têm uma característica marcante de formar homodímeros ou heterodímeros uns com os outros. Cada uma destas proteínas parece ter funções intrínsecas distintas, porém estas funções podem ser neutralizadas quando ocorrem heterodimerizações entre seus membros (AKGUL; MOULDING; EDWARDS, 2004). A relação de formação desses dímeros entre esses antagonistas e agonistas apoptóticos parece ser determinante para a entrada ou não da célula no processo de apoptose (ZINKEL; GROSS; YANG, 2006). Alguns estudos têm mostrado uma taxa de diminuição de apoptose em linfócitos B infectados com o VLB, ao mesmo tempo em que se tem

observado em estudos *in vivo* que o aumento da razão bcl-2/bax está relacionado com a leucemogênese induzida pelo VLB (REYES; COCKERELL, 1998).

O gene p53 é o gene supressor de tumor mais estudado, e ele atua parando o ciclo celular frente a algum estímulo estressante como danos ao DNA ou ativação de algum oncogene. Esta parada no ciclo ocorre para que o dano seja reparado ou então, sendo o reparo inviável, a célula entre em apoptose (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2007). Dos mais de 150 genes relacionados com o p53, a maioria está envolvida com o reparo do DNA, apoptose e o controle da parada do ciclo celular. Estes fazem parte de uma via complexa de sinalização que é responsável por prevenir a proliferação de células defeituosas (BODE; DONG, 2004). A proteína p53 na ausência de estímulos estressantes tem meia vida curta e se mantém em baixos níveis, porém sob estresse p53 é estabilizada e se acumula no núcleo. Sob esta forma ativa, p53 atua como um ativador ou repressor de transcrição nuclear que vai atuar nos diversos genes já citados anteriormente (LEVINE et al., 1994; CORDONE et al., 1998). O principal mecanismo de estabilização de p53 parece ser a fosforilação, embora a acetilação também se mostre importante no seu processo de estabilização e ativação como fator de transcrição. Embora p53 seja uma proteína primariamente do núcleo, ela pode ter ação também fora do núcleo interagindo com outras proteínas (OTTAGGIO et al., 2000). No desenvolvimento do câncer ela parece ter importante papel, uma vez que é alvo de milhares de mutações em diversas neoplasias, que em grande parte a inativa e promove seu acúmulo dentro da célula (GAITONDE et al., 2000). O aumento de sua meia vida, devido ao fenótipo alterado, proporciona sua detecção através de técnicas

imunológicas utilizando anticorpos monoclonais anti-p53, embora nem sempre a proteína alterada possa ser detectada (CORDONE et al., 1998).

A interação com vírus ou com oncoproteínas pode promover inativação da proteína p53 (OTTAGGIO et al., 2000). Alguns pesquisadores mostraram que tumores de células infectadas com VLB produzem mutações de p53. As principais mutações encontradas por este grupo foram a missense e as principais localizações, chamadas de “hot spot” do gene p53 na Leucose Enzoótica Bovina, foram nos códons 206 (troca de arginina por lisina), 207 (troca de histidina por prolina), 241 e 242 (troca de arginina por triptofano). Algumas mutações pontuais silenciosas também foram encontradas nos códons 185 e 189 (TAJIMA et al., 1998). Quanto a estas mutações que ocasionam inativação de p53, este parece ser um dos eventos críticos associados com a tumorigênese, desempenhando uma função iniciadora em alguns cânceres e contribuindo para a progressão tumoral em outros (DEES et al., 1996; WILLEMS et al., 2000). Estudos relacionando o gene p53 com o desenvolvimento das neoplasias induzidas pelo VLB mostraram que 50% de tumores em bovinos induzidos pelo vírus apresentavam mutações em p53 enquanto poucas mutações foram encontradas em linfócitos B de bovinos com LP e nenhuma mutação foi encontrada em células de animais não infectados (WILLEMS et al., 2000). Estes resultados sugerem que as mutações no gene p53 parecem estar associadas a estágios finais da doença induzida pelo VLB (KOMORI, 1996; ISHIGURO et al., 1997). Resultados semelhantes foram observados em humanos na leucemia de células T (LCT) em adultos induzidas pelo HTLV, sugerindo que o estudo da LEB pode ser um bom modelo para o estudo da LCT (TAJIMA et al., 1998).

Alguns estudos corroboram o envolvimento dos genes bcl-2 e p53 na carcinogênese induzida pelo VLB, indicando que a estratégia anti-apoptótica pode de fato contribuir para a patogênese da infecção viral além de contribuir para a promoção da capacidade oncogênica de alguns vírus (YOUNG; DAWSON; ELIOPOULOS, 1997).

2.3 Imunofenotipagem de linfócitos

Os receptores de antígenos dos linfócitos são as estruturas mais importantes que estes exibem em sua superfície, sendo que apenas após sua identificação foi possível a diferenciação entre linfócitos B e T (TIZARD, 2004). Eles podem ser divididos em receptores de células B (RCB) e receptores de células T (RCT), que são estruturas protéicas complexas responsáveis por transduções de sinais e ligação com os antígenos. Cada molécula protéica tem um nome químico ou funcional além de um grupo de diferenciação (se utiliza a sigla CD) (JANEWAY et al., 2001). O prefixo CD geralmente é procedido de um número seqüencial que representa cada molécula. Quando a molécula ainda não está completamente caracterizada, é utilizada a nomenclatura CDw (LAI et al., 1998). O nome comum da molécula também pode ser utilizado se este é bem aceito ou descreve sua função como, por exemplo, o $Fc\alpha R$ (CD89) e a L-selectina (CD62L). As moléculas CD das células de animais domésticos quase sempre possuem homólogas em humanos ou ratos e quando estas não possuem é utilizado o prefixo WC (workshop cluster) (LUNNEY et al., 1994; TIZARD, 2004). A nomenclatura CD é bastante utilizada para as moléculas CD4 e CD8 por já serem bem usuais. CD4 é encontrado apenas em células que reconhecem antígenos

exógenos, como LT auxiliares, macrófagos, neutrófilos, variando de acordo com a espécie. Diferentemente de CD4, CD8 é uma molécula encontrada em células que reconhecem antígenos endógenos como os LT citotóxicos (TIZARD, 2004). Enquanto CD4 faz parte de receptores que se ligam as moléculas apresentadoras de antígenos do complexo de histocompatibilidade principal classe II (CHP II), os CD8 fazem parte dos que se ligam as moléculas CHP I. As CHP I estão presentes em praticamente todas as células nucleadas enquanto as CHP II estão presentes apenas em células especializadas em apresentação de antígenos como macrófagos, células dendríticas e LB (MURPHY et al., 1999; JANEWAY et al., 2001; ALBERTS et al., 2006). Os LT possuem duas populações distintas de acordo com os diferentes RCT e são divididos entre aqueles que são formados por cadeias de peptídeos α e β (RCT α/β) e aqueles que são formados por cadeias δ e γ (RCT δ/γ). Os LB também possuem subpopulações de RCB que utilizam cadeias α , β , δ , γ e ϵ , além de liberarem nos tecidos e no sangue seus RCBs, que são chamados de anticorpos (PINK et al., 1970; MARTIN, 1969)

Além dos receptores de antígenos específicos os LB e LT também possuem algumas moléculas de superfície específicas. Somente os LT, por exemplo, possuem CD3, que são um grupo de proteínas responsáveis pelo principal meio de transdução de sinal dos RCT. Já CD79 exerce a mesma função nos RCB que está presente apenas nos LB. Devido a estas singularidades algumas destas moléculas são utilizadas como marcadores específicos em testes imunológicos específicos de diferenciação entre células (MASON et al., 1995; AQUINO et al., 2000).

2.3.1 Antígenos de superfície de linfócitos B

Estudos recentes têm mostrado que, assim como em humanos, os linfócitos B de bovinos apresentam uma classificação quanto aos antígenos de superfície, origem, distribuição no organismo e função. O primeiro tipo chamado de linfócito B-1a apresenta CD5+ e CD11b+. Esta linhagem tem vida longa e uma autoprodução para suprir seu número no organismo. O segundo tipo é chamado de linfócito B-1b e apresentam CD5- e CD11b+ e são semelhantes aos linfócitos B1-a no tamanho e produção, embora sejam produzidos também na medula óssea. Ambas as famílias B-1a e B-1b formam a família de linfócitos B-1. O terceiro tipo de células apresenta CD5- e CD11b- e é chamado de linfócito B-2. Esta última família tem uma vida menor que a da família B-1 (YIN et al., 2003).

No desenvolvimento da LEB podemos descrever que aproximadamente 30 a 70% dos animais infectados apresentam um número aumentado de linfócitos B maduros CD5+, CD11b+/c+, cerca de meses a anos após a infecção e que de um a seis anos após a infecção eles desenvolvem linfoma de células B (SCHWARTZ-CORNIL et al., 1997). O linfoma desenvolvido nos bovinos tem um imunofenótipo consistente que corresponde a células B maduras (VERNAU et al., 1997) O heterodímero formado pelas moléculas CD79α e CD79b, e CD79b está associado ao RCB e é responsável pela via de transdução de sinais destes receptores (TIZARD, 2004).

2.4 Alterações histopatológicas observadas na Leucose Enzoótica Bovina

De uma maneira geral os linfomas caracterizam-se histologicamente pela perda da arquitetura tecidual normal. Situados dentro de dois padrões histológicos então denominados difuso e folicular, os linfomas variam morfológicamente em tamanho, características nucleares e taxa de mitose. Estas características classificam os linfomas quanto ao comportamento em baixo, intermediário e alto grau, de acordo o padrão histológico apresentado. Desta forma, linfomas de células pequenas, bem diferenciadas e com baixa taxa de mitose são de baixo grau. Os de células grandes, pobremente diferenciadas e com alta taxa de mitose são de alto grau (FRY; MCGAVIN, 2007). Em bovinos, os aspectos microscópicos de todas as formas são semelhantes (BARROS, 2007) e, geralmente, são de um padrão difuso, podendo se compor de células clivadas ou não clivadas e raramente são do tipo folicular (JONES; HUNT; KING, 2000).

2.5 O gene p53

A proteína p53 foi primeiramente descoberta no início dos anos 80 e o gene que a codifica possui um tamanho modesto de 11 exóns e 393 aminoácidos (HUSSAIN; HARRIS, 2006). Sua localização está no braço curto do cromossomo 17 na região 17p13.1 (FUTREAL; BARRET; WISEMAN, 1991). Interessantemente a princípio foi atribuído à p53 um fraco potencial oncogênico. Estes estudos foram realizados a partir da transformação celular induzida pelo vírus símio (SV-40) em células neoplásicas de humanos e de roedores. No final dos anos 80 descobriu-se então que as linhagens de

células neoplásicas utilizadas continham a forma mutante de p53, e estudos com a forma original da proteína descobriram seu papel fundamental na supressão da transformação neoplásica. O papel crítico na carcinogênese atribuído ao p53 veio com a descoberta de que suas mutações estavam presentes em uma grande variedade de cânceres humanos (HUSSAIN; HARRIS, 2006) além de ser a alteração genética mais comum observada em neoplasias malignas (BENNETT et al., 1992). A figura 4 representa o histórico da descoberta das funções do gene p53.

Fonte: HUSSAIN e HARRIS, 2006

Figura 4 - Histórico das funções do gene p53 no decorrer do tempo

As diferentes mutações no gene p53 passam em número de 20000 (HUSSAIN; HARRIS, 2006), e o espectro de mutações varia consideravelmente entre os diferentes cânceres (WELSH; CASTRÉN; VAHAKANGAS, 1997). Mais de 98% das mutações em

p53 observadas em humanos estão nos exóons 5 a 8, que apresentam 4 de 5 regiões conservadas durante a evolução e parecem ser críticas para sua função normal (JOHNSON; COUTO; WEGHORST, 1998). A mutação predominante é a missense, no qual as proteínas codificadas para transcrição pelo gene apresentavam troca de aminoácidos e desta forma tinham sua função alterada. Estas alterações nas proteínas não apenas inativam a função supressora de tumor de p53, mas também interferem em genes que o p53 atua como fator de transcrição, aumentando assim seu potencial oncogênico (HUSSAIN; HARRIS, 2006).

As mutações observadas em p53 podem promover perda da função da proteína codificada embora em sua maioria a proteína alterada apresente ganho em sua função. Alguns pesquisadores têm mostrado que esse aumento de função confere um pior prognóstico em relação a mutações que promovem perda de função de p53 durante a carcinogênese de tumores de pele. Estes resultados podem influenciar fortemente no desenvolvimento de terapias que desencadeiam aumento da função em p53 (CAULIN et al., 2007).

Os níveis celulares de p53 são determinados principalmente pelo balanço entre a síntese e degradação da proteína que está acontecendo na célula. Geralmente em células normais e fora de condições de estresse a proteína p53 é mantida em baixas concentrações por sua meia vida ser relativamente baixa, cerca de 20 minutos (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000). A degradação da p53 é mediada por ubiquitinação. A ubiquitina se liga à proteína e atua como uma bandeira, que é identificada pela maquinaria de degradação protéica. Outro mecanismo que permite que p53 se mantenha em baixos níveis na célula é a presença de formas inativas de p53, que para serem ativadas devem receber um sinal ou sofrer alteração para ter sua

função ativa. A ativação de p53 se dá por uma variedade de estímulos de estresse, como danos ao DNA, bloqueio na transcrição, hipóxia, sinalização desregulada de oncogenes, exposição à radiação γ , dentre outros (HONG et al., 2006). O aumento dos níveis de p53 se dá provavelmente pelo aumento da meia vida de p53 desencadeado pelo aumento das taxas de iniciação translacional do RNAm de p53 e este aumento é proporcional a extensão do dano ao DNA (LEVINE, 1997). Os três principais mecanismos moleculares que parecem conduzir ao acúmulo excessivo da proteína p53 são as mutações com mudança conformacional, formação de complexos com oncoproteínas virais e expressão anormal do gene p53 devido a alterações de fatores de transcrição celular. Devido a sua frequência e especificidade do acúmulo excessivo da proteína p53, a detecção de altos níveis dessa proteína tem sido utilizada como um biomarcador para o câncer (BENNETT et al., 1992).

O papel de p53 na indução da apoptose sob a perspectiva terapêutica parece ser mais importante do que aquele envolvido na parada do ciclo celular, uma vez que a maioria dos agentes antineoplásicos atuam induzindo apoptose nas células neoplásicas (WILLIS; CHEN, 2002).

2.6 O gene bcl-2

O gene bcl-2 foi primeiramente identificado em um ponto de quebra cromossômica contido em linfomas de células B e interessante essa nova classe de oncogenes atuava inibindo o processo de apoptose e não promovendo proliferação celular. (SCHMITT et al., 2007). O bcl-2 tem sido amplamente estudado por mais de

duas décadas e quase todos seus efeitos na carcinogênese têm sido atribuídos por sua inibição na via da apoptose embora se saiba que membros de sua família também participem de outros processos celulares como progressão do ciclo celular, homeostase de glicose e repressão transcricional através de p53 (PATTINGRE; LEVINE, 2006).

A proteína bcl-2 tem 26 KDa e é formada por uma cadeia de 239 aminoácidos (TOMADAKI; SCORILAS, 2006). A família de proteínas bcl-2 é dividida em dois grupos principais sendo um grupo que compartilha uma alta homologia estrutural e funcional com bcl-2 e tem atividade anti-apoptótica e outro grupo que possui uma menor homologia estrutural e apresenta atividade pró-apoptótica. Este último grupo ainda é dividido em um subgrupo com bcl-2 associado à proteína X como fatores de morte, chamado BAX, e outro contido apenas por proteínas que transportam somente o domínio BH3. As regiões de homologia contidas nas proteínas desta família são chamadas BH. Este domínio corresponde à configuração da α -hélice na proteína. Estudos têm demonstrado que a configuração da α -hélice é quem vai permitir uma interação entre os membros pró e anti-apoptóticos da família bcl-2 e desta forma promover ou não a dimerização entre seus membros.

As quatro regiões de homologia dos membros da família de bcl-2 são a BH1, BH2, BH3 e BH4. Pelo menos um dos quatro domínios de homologia podem ser observados nos membros da família bcl-2 (MANION; HOCKENBERY, 2003). Os membros anti-apoptóticos geralmente contém de três a quatro regiões de homologia e estão presentes principalmente na membrana mitocondrial externa, podendo também

ser detectadas nas membranas do retículo endoplasmático e do núcleo. O papel principal desempenhado por esta proteína na membrana mitocondrial parece ser na contenção da liberação do citocromo c para o citosol (TOMADAKI; SCORILAS, 2006). A ligação do citocromo c com o fator de ativação de apoptose-1 acabaria promovendo a ativação da cascata das caspases o que levaria a célula a entrar em apoptose (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2007). Os membros pró-apoptóticos são menos conservados e geralmente perdem o domínio aminoterminal BH4. O domínio BH3 nesta família é extremamente conservado e parece desenvolver um papel crucial no processo de dimerização com os membros de bcl-2. A exposição do domínio BH3 seja de forma constitutiva ou por modificação pós-translacional parecem ser essencial para a dimerização dos membros pró-apoptóticos da família bcl-2. Os membros anti-apoptóticos da família bcl-2 são inativados quando formam dímeros com os membros pró-apoptóticos. A razão da atividade dos membros pró e anti-apoptose dos membros da família de bcl-2 parece ser o que determina a sensibilidade ou resistência das células aos estímulos apoptóticos (TOMADAKI; SCORILAS, 2006).

Experimentos com expressão transgênica de bcl-2 aumentaram significativamente o tempo de vida de tumores de células B, sugerindo que a superexpressão de bcl-2 aumentaria a suscetibilidade a linfomas de células B. O mecanismo que proporcionaria a transformação neoplásica seria que, com o aumento do tempo de vida das células, elas estariam mais expostas a acumular mutações oncogênicas (ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2006).

Objetivos

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo estudar a biologia da linfomagenese em bovinos naturalmente infectados com o vírus da Leucose Enzoótica Bovina. Para tanto, foram realizados exames e imunoistoquímica das amostras dos tecidos dos animais infectados. Nestes estudos foram avaliados:

- Imunofenotipagem dos linfócitos das amostras dos tumores.
- Imunomarcção da proteína p53.
- Imunomarcção da proteína bcl2.

Justificativa

4 JUSTIFICATIVA

A imunofenotipagem das amostras foi realizada com o objetivo de avaliar a presença predominante de linfócitos B nos tecidos tumorais. De posse dos resultados, foram feitos escores de marcação das proteínas p53 e bcl-2, conhecidamente envolvidas na estabilidade genômica e no processo de apoptose. Uma posterior avaliação dos escores foi realizada para possível correlação entre escores alterados de marcação de p53 e bcl-2 e o processo de linfomagenese na Leucose Enzoótica Bovina.

Materiais e Métodos

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em diversas etapas conforme descrito nos itens abaixo.

5.1 Obtenção e processamento do material

Foram utilizadas amostras de casos espontâneos da doença de vinte animais bovinos em que se possuía o histórico, exames complementares, diagnóstico sorológico positivo (pelo método de imunodifusão em agar gel) para presença do VLB. As amostras foram coletadas entre os anos de 1973 e 2003 e eram provenientes do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). Como conduta de rotina dessas instituições, após os procedimentos rotineiros de necropsia, os fragmentos teciduais eram coletados, avaliados, fixados em formalina à proporção de 10% para posteriormente serem incluídos em parafina. Os fragmentos coletados eram de linfonodos, fígado, abomaso, esôfago, coração e intestino, conforme quadro 3.

Para o estudo comparativo foram utilizadas amostras de dez bovinos mestiços provenientes do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sete machos e três fêmeas, entre 5 e 7 anos e soronegativos para o VLB, como descritos no quadro 4.

O material foi então processado no Laboratório de Histopatologia do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo, com espessuras entre 3 e 4 μm . Após serem cortados os materiais foram colocados em lâminas histológicas e permaneceram 24 horas em estufa com temperatura entre 55 e 58°C. Os cortes de 3 a 4 μm foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e através do estudo histopatológico descritivo foi feita a seleção de material para estudos com emprego de técnicas de imunoistoquímica.

O principal critério de seleção utilizado foi o estado de conservação do material, avaliado microscopicamente através das lâminas coradas com HE, eliminando as amostras que apresentassem autólise.

5.2 Padronização da técnica de imunoistoquímica

Para padronização da técnica de imunoistoquímica, blocos de parafina das amostras foram cortados em micrótomo com espessura de 3 a 4 μm e passados para lâminas de vidro, previamente tratadas com Organosilano (Sigma A3648), com o objetivo de promover a adesão dos cortes às lâminas, e estas colocadas em estufa por 24 horas em temperatura entre 55 e 58°C.

Depois de retiradas da estufa foram colocadas em uma cuba de vidro vertical com xilol, na qual passaram três vezes (trinta minutos em cada), para desparafinização. Em seguida, foi realizada a reidratação em soluções aquosas de álcool etílico, na qual

passaram três vezes em álcool absoluto (cinco minutos em cada), uma vez em álcool 95° (cinco minutos), uma vez em álcool 70° (cinco minutos) e uma vez em água destilada (cinco minutos).

Iniciou-se então a recuperação antigênica, com o propósito de liberar os epítomos antigênicos do tecido, bloqueados pela solução fixadora (formol tamponado a 10%). A técnica foi feita com solução de citrato 10mM (1000ml de água destilada e 1,921g de ácido cítrico monohidratado de peso molecular 192,13 com pH 6,0, ajustado em medidor de pH com hidróxido de sódio). Esta solução foi colocada em cuba de vidro horizontal na qual as lâminas foram introduzidas paralelamente e incubadas em forno de microondas por 12 minutos. Ao sair do microondas, a cuba foi mantida em temperatura ambiente até esfriar.

Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena por incubação do material em solução de 5% de água oxigenada a 20 volumes (20 ml) e álcool metílico (80 ml), durante 30 minutos. Posteriormente, o material foi lavado em solução tamponada com fosfato (PBS), 0,01M (pH7,0) por cinco minutos, com três repetições.

Após essa etapa, foi realizada a diluição dos anticorpos, cobriram-se os cortes com os anticorpos primários e incubaram-se em câmara úmida por 18 horas (“overnight”) à temperatura de 4°C. Inicialmente os anticorpos foram diluídos em concentrações indicadas para uso humano, com posterior otimização. Os melhores resultados advieram utilizando-se 1:100, 1:35, 1:100 e 1:100, para p53, bcl-2, CD3 e CD79α, respectivamente.

Na seqüência realizaram-se três banhos com PBS (cinco minutos cada), depois foi feita a incubação por trinta minutos com o anticorpo secundário biotinilado contra imunoglobulina de camundongo, coelho e cabra (Kit LSAB -cód. K0690, Dako Corporation, Carpinteria, USA). Após três lavagens com PBS (cinco minutos cada), incubou-se o material por mais trinta minutos, com a solução estreptoavidina-peroxidase (Kit LSAB -cód. K0690, Dako Corporation, Carpinteria, USA), finalizando-se o processo com mais três lavagens de cinco minutos cada, em PBS.

Para a visualização e revelação da reação, utilizou-se o cromógeno a base de diaminobenzidina (DAB), banhando as lâminas por 3 segundos (cód. K-3468- Dako Corporation, Carpinteria, USA) e logo após em PBS, para interrupção da reação. Em seguida, foram lavadas em água corrente e passadas em água destilada.

Prosseguiu-se com a contracoloração em Hematoxilina de Harrys pura por um minuto, lavagem em água corrente e desidratação. Esta etapa consistiu em uma passagem em álcool 70°, uma em álcool 95°, três em álcool absoluto e três em xilol (cinco minutos cada etapa). Cobriram-se as lâminas com lamínulas, aderindo-as com resina sintética (ENTELLAN-MERCK) e lamínulas histológicas.

5.3 Avaliação da imunomarcção

Para avaliação da imunomarcção, a fim de obter-se a representatividade, foram selecionados aleatoriamente 10 campos histológicos não repetidos, dentro das lesões de cada lâmina. Os campos foram observados com ocular microscópica que permitia

ampliação de 400 vezes. Foram digitalmente fotografados e transferidos para um microcomputador, utilizando o software Image pro-Plus (Media Cybernetics®) para a captura de imagens e limitação do campo. Nas imagens então disponíveis, eram observadas e contadas todas as células disponíveis em cada campo. Os valores obtidos então eram somados até que pelo menos mil células tumorais tivessem sido avaliadas. Em seguida, foram construídos índices de imunomarcação baseados na percentagem de células positivas em relação ao número total de células contadas, conforme apresentado no quadro 1. A marcação dos anticorpos contra CD3 e CD79 são citoplasmáticas ou em membrana. A marcação de bcl2 pelos anticorpos é somente citoplasmática e a de p53 é nuclear.

Escore	Significado
-	Marcação ausente
+	Marcação positiva em menos de 30% das células
++	Marcação positiva em 30% a 70% das células
+++	Marcação positiva em mais de 70% das células

Quadro 1 - Escores aplicados na análise da imunomarcação

Anticorpo	Espécie	Característica	Fonte	Diluição	Tempo de incubação	Método de detecção
CD3	CD3 Humano	policlonal	Dako	1:100	“overnight”	LSAB
CD79α	CD79 Humano	monoclonal	Dako	1:100	“overnight”	LSAB
BCL-2	BCL-2 Humano	policlonal	Sta Cruz	1:35	“overnight”	LSAB
P53	P53 Humano	Monoclonal	Dako	1:100	“overnight”	LSAB

Quadro 2 - Características e descrição do emprego dos anticorpos primários utilizados nas reações imunoistoquímicas

Nº Bovino	Idade (anos)	Sexo	Raça	órgão
1	4,0	F	Holandesa	Linfonodo
2	5,5	F	Mestiço	Linfonodo
3	7,0	M	Mestiço	Fígado
4	4,0	M	Mestiço	Linfonodo
5	4,0	M	Hereford	Abomaso
6	8,0	F	Hereford	Abomaso
7	5,0	M	Mestiço	Linfonodo
8	7,0	M	Hereford	Linfonodo
9	10,0	M	Mestiço	Esôfago
10	8,0	F	Holandesa	Fígado
11	8,0	F	Holandesa	Coração
12	6,0	F	Holandesa	Linfonodo
13	7,0	F	Charolês	Linfonodo
14	3,0	M	Mestiço	Abomaso
15	8,0	F	Holandesa	Coração
16	7,0	F	Holandesa	Intestino
17	6,0	F	Holandesa	Fígado
18	8,5	F	Jersey	Fígado
19	10,0	F	Mestiço	Abomaso
20	9,0	F	Mestiço	Linfonodo

Quadro 3 - Relação de idade, sexo, raça e órgãos coletados dos animais com LEB

Nº Bovino	Idade	Sexo	Raça	Orgão
21	5	F	Mestiço	Intestino
21	5	F	Mestiço	Linfonodo
22	4	M	Mestiço	Intestino
22	4	M	Mestiço	Linfonodo
23	6	M	Mestiço	Intestino
23	6	M	Mestiço	Linfonodo
24	4	M	Mestiço	Intestino
24	4	M	Mestiço	Linfonodo
25	5	M	Mestiço	Intestino
25	5	M	Mestiço	Linfonodo
26	4	F	Mestiço	Intestino
26	4	F	Mestiço	Linfonodo
27	7	M	Mestiço	Intestino
27	7	M	Mestiço	Linfonodo
228	5	M	Mestiço	Intestino
28	5	M	Mestiço	Linfonodo
29	5	F	Mestiço	Intestino
29	5	F	Mestiço	Linfonodo
30	4	M	Mestiço	Intestino
30	4	M	Mestiço	Linfonodo

Quadro 4 - Relação de idade, sexo, raça e órgãos coletados dos animais controle

5.4 Anticorpos

A técnica de imunoistoquímica foi empregada para a identificação de linfócitos T (CD3), linfócitos B (CD79 α), proteína p53 e bcl-2, conforme quadro 2.

5.4.1 Linfócitos T

Foi feito o uso do anticorpo policlonal, coelho anti-humano, CD3 (Dako Corporation, Carpinteria, cód. A0452, USA).

5.4.2 Linfócitos B

Como marcador de linfócitos B e plasmócitos empregou-se o anticorpo monoclonal, camundongo anti-humano, CD79 α (clone HM 57, Dako Corporation cód. M 7051, Carpinteria, USA).

5.4.3 Proteína p53

Foi empregado o anticorpo monoclonal, camundongo anti-humano, p53 (clone DO-7, Dako Corporation cód. M 7001, Carpinteria, USA).

5.4.4 Proteína bcl-2

Foi feito o uso do anticorpo policlonal, coelho anti-humano, bcl-2 (clone Δ 21, Santa Cruz Biothecnology cód. SC – 783, Santa Cruz, USA).

5.5 Soluções e Reagentes

Os reagentes utilizados para o preparo das soluções foram:

5.5.1 Solução citrato 10mM

A Solução citrato foi preparada adicionando-se 18 ml da solução A e 82 ml da solução B em 1000 ml de água destilada, pH 6,0.

- Solução A: 29,4 g de ácido cítrico monohidratado ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) em 1000 ml de água destilada.

- Solução B: 21,01 g de citrato de sódio dihidratado ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) em 1000 ml de água destilada.

5.5.2 Solução tampão fosfato (PBS)

Os reagentes (quadro 5) foram diluídos em 1000 ml de água destilada, pH 7,0. Solução dez vezes concentrada.

Componentes	Quantidade
Cloreto de sódio (Synth - NaCl)	8,5g
Fosfato de sódio dibásico dihidratado (Merck - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	3,89 g
Fosfato de sódio monobásico (Merck - KH_2PO_4)	10,61g

Quadro 5 – Formulação da solução tampão fosfato. São Paulo, 2007

5.6 Análise Estatística

Os dados finais correspondem à média de cada grupo acompanhada pelo respectivo desvio padrão.

Os dados referentes à contagem de células imunomarcadas positivamente foram submetidos ao teste paramétrico de análise de variância ANOVA-one way e ao correspondente pós-teste, de Turkey-Kramer, para comparação múltipla de grupos e identificação das diferenças significantes. Considerou-se estatisticamente significativa os valores de $P < 0,01$.

Resultados

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão descritos nos itens abaixo

6.1 Relação entre a LEB e a idade dos animais acometidos de onde foram coletadas as amostras de tecido

Os resultados apresentados no gráfico 1 mostram que no presente estudo a prevalência de animais acometidos pela LEB sob a forma de linfossarcoma acontecem principalmente em animais com idade superior a seis anos.

Gráfico 1 - Faixa de Idade dos animais acometidos com a LEB

6.2 Relação entre a LEB e as raças dos animais acometidos de onde foram coletadas as amostras de tecido

O gráfico 2 apresenta as diferentes raças dos animais de onde foram coletadas as amostras de tecidos para realização do experimento. Pode-se observar a predominância de animais mestiços e da raça holandesa embora animais das raças Jersey, Charolês e Hereford também tenham sido acometidos.

Gráfico 2 - Raças acometidas pela LEB, relativas as amostras dos tecidos coletados

6.3 Relação entre a LEB e o sexo dos animais acometidos de onde foram coletadas as amostras de tecido

O gráfico 3 mostra uma predominância de fêmeas em relação aos machos na ocorrência da LEB. A predisposição sexual não existe para o VLB. O que se pode observar é um maior acometimento em rebanhos de produção de leite onde os animais tem uma vida média maior e desta forma um tempo mais adequado para o desenvolvimento da doença.

Gráfico 3 - Sexo dos animais acometidos pela LEB, relativos as amostras dos tecidos coletados

6.4 Relação dos órgãos de onde foram coletados os tecidos neoplásicos nos animais acometidos com a LEB

Dentre os órgãos coletados observou-se a predominância de linfonodos. Outros órgãos como fígado, abomaso, coração, esôfago e intestino também foram coletados, conforme gráfico 4.

Gráfico 4 - Raças acometidas pela LEB, relativas as amostras dos tecidos coletados

6.5 Imunofenotipagem das células dos campos analisados nas lâminas

Os resultados (gráfico 5) do trabalho mostram uma marcação que representa uma imunoreatividade de 11% das amostras coletadas para os anticorpos específicos contra CD3 e 81% de marcação para anticorpos específicos contra CD79. Os 8% percentuais restantes representam as células não marcadas.

Gráfico 5 - Percentual de marcação quanto aos antígenos de superfície

O quadro 6 apresenta os percentuais de imunomarcação de cada animal do grupo afetado para CD3, CD79 e células não marcadas.

Nº Bovino	% CD3	% CD79	% Células não marcadas
1	7,46	85,80	6,74
2	13,92	86,00	0,08
3	14,24	85,70	0,06
4	11,54	81,70	6,76
5	17,83	80,84	1,33
6	9,08	82,74	8,18
7	15,29	74,94	9,77
8	5,73	83,61	10,66
9	20,07	80,08	0,15
10	12,40	88,00	0,4
11	8,92	86,37	4,71
12	11,19	88,69	0,12
13	12,45	84,26	3,29
14	8,77	65,49	25,74
15	4,89	79,83	15,28
16	7,10	70,90	22,00
17	5,98	76,69	17,33
18	8,09	82,11	9,8
19	9,13	81,77	9,1
20	7,67	77,05	15,28

Quadro 6 - Percentuais de imunomarcaco das amostras de tecido coletadas de animais acometidos pela LEB para os antgenos de superfcie CD3 e CD79

6.6 Escore de imunomarcção para as proteínas p53 e bcl-2 nas amostras dos tecidos coletados

De acordo com os escores estabelecidos, através dos percentuais de imunomarcção, descritos no tópico de matérias e métodos, pôde-se observar que todas as amostras de tecidos apresentaram escore (++) para o anticorpo específico contra p53. A imunomarcção para a proteína bcl-2 apresentou diferentes escores de marcação variando de (+) a (+++) com predominância para o escore (++) que se apresentou em 17 das 20 amostras. O quadro 7 apresenta além dos escores os percentuais relativos a imunomarcção de p53 e bcl-2 das amostras.

O quadro 8 apresenta os escores de imunomarcção para os anticorpos específicos contra p53 e bcl-2 e seus respectivos percentuais relativos ao grupo controle. Nenhuma amostra apresentou imunoreatividade à p53. Com relação à bcl-2, todas as amostras apresentaram escore (+).

Nº Bovino	%p53	% Bcl-2	Escore p53	Escore bcl2
1	56,6	41,02	++	++
2	51,21	37,08	++	++
3	53,56	64,57	++	++
4	52,11	52,04	++	++
5	63,25	49,91	++	++
6	46,49	26,71	++	+
7	62,69	51,46	++	++
8	53,07	49,55	++	++
9	61,12	64,98	++	++
10	44,91	48,57	++	++
11	49,78	45,35	++	++
12	56,35	70,69	++	+++
13	50,13	52,01	++	++
14	48,46	27,62	++	+
15	57,08	43,5	++	++
16	67,34	42,62	++	++
17	56,76	64,04	++	++
18	52,20	53,78	++	++
19	67,56	68,78	++	++
20	68,32	50,88	++	++

Quadro 7 - Escores de imunomarcaco dos animais positivos e seus respectivos percentuais relativos -So Paulo- 2007

Nº Bovino	%p53	% Bcl-2	Escore p53	Escore bcl2
21*	0	9,48	-	+
21**	0	4,09	-	+
22*	0	20,17	-	+
22**	0	10,41	-	+
23*	0	11,17	-	+
23**	0	10,23	-	+
24*	0	7,65	-	+
24**	0	8,74	-	+
25*	0	9,23	-	+
25**	0	7,97	-	+
26*	0	10,76	-	+
26**	0	12,13	-	+
27*	0	14,49	-	+
27**	0	8,65	-	+
28*	0	14,21	-	+
28**	0	12,93	-	+
29*	0	10,35	-	+
29**	0	11,01	-	+
30*	0	9,79	-	+
30**	0	13,83	-	+

* Amostra de intestino ; ** Amostra de linfonodo

Quadro 8 - Escores de imunomarcaco dos animais controle e seus percentuais relativos com relao  p53 e bcl-2 -So Paulo- 2007

O gráfico 6 mostra a diferença significativa entre a imunomarcação para a proteína bcl-2 do grupo afetado e o grupo controle. O valor percentual médio e o respectivo desvio padrão do grupo afetado e controle observados foram $50,26 \pm 12,25$ e $10,86 \pm 3,30$ respectivamente, conforme mostrado no quadro 9.

Gráfico 6 - Percentual de marcação médio de bcl-2 entre o grupo afetado e o grupo controle -São Paulo- 2007

bcl-2 afetado (%)	bcl-2 controle (%)
50,26 ± 12,25	10,86 ± 3,30

Quadro 9 - Valores médios percentuais e desvio padrão para imunomarcação de bcl-2 no grupo afetado e controle

O gráfico 7 apresenta a não marcação da proteína p53 no grupo controle e escore de marcação (++) para os animais afetados. O valor percentual médio e o respectivo desvio padrão do grupo afetado e controle observados foram $55,95 \pm 7,07$ e zero respectivamente, conforme mostrado no quadro 10.

Gráfico 7 - Percentual de marcação médio de p53 entre o grupo afetado e o grupo controle -São Paulo- 2007

p53 afetado (%)	p53 controle (%)
$55,95 \pm 7,07$	0,00

Quadro 10 - Valores médios percentuais e desvio padrão para imunomarcagem de p53 no grupo afetado e controle

Discussão

7 DISCUSSÃO

Os resultados do trabalho são coerentes com os dados da literatura, onde podemos observar que a grande maioria dos animais apresenta idade superior a seis anos (BARROS, 2007). Isso se dá devido ao retrovírus ser um vírus lentamente oncogênico que quase sempre necessita de um grande período de incubação para que as múltiplas etapas da carcinogênese ocorram e o câncer se desenvolva.

As diferentes raças acometidas apresentadas pelo trabalho está de acordo com a literatura mostrando que não existe predileção por raças. O maior número de animais acometidos da raça holandesa e de animais mestiços provavelmente está relacionado com a característica dos rebanhos de onde foram coletadas as amostras. As propriedades eram de produção leiteira e as raças específicas para este fim. A resistência apresentada ao VLB por alguns animais está relacionada a características genéticas associadas ao seu Complexo de Histocompatibilidade Principal (CHP) (TIZARD, 2004), o que ainda não foi determinado entre as diferentes raças e também não é o foco deste trabalho, logo também não pode ser observado em nossos resultados.

Os órgãos coletados representam bem a predominância do acometimento de órgãos linfóides, uma vez que a neoplasia associada à doença é de linfócitos. Outros órgãos também podem ser acometidos uma vez que o tecido linfóide está distribuído por todo o organismo e também porque a neoplasia apresenta muitas vezes característica infiltrativa.

O desenvolvimento da imunoistoquímica permitiu a identificação fenotípica de células normais e neoplásicas (YIN et al., 2003). Para determinação da imunofenotipagem na diferenciação entre os linfócitos B e T os conhecidos marcadores específicos CD79 α e CD3 são utilizados para determinação da origem das células neoplásicas. Células CD79 α positivas caracterizam origem em LB e células CD3 positivas caracterizam origem em LT (VALENTINE; MCDONOUGH, 2003 e IKEDA et al., 2005). A fosfoproteína p53 é geralmente localizada no núcleo, embora não costume ser detectada em células normais devido a sua meia vida curta (MELHEM, 1995). Diferentemente da situação em células normais, p53 pode ser observada em vários cânceres, sendo o principal alvo de alterações moleculares em todas as neoplasias (SOUSSI, 2000). Mutações no gene p53 parecem desencadear sua inativação e formação de produtos com anormalidades. Sob esta condição a proteína p53 alterada apresenta como principal característica o aumento de sua estabilidade. Essa estabilidade aumentada desencadeia seu acúmulo tornando possível sua detecção pela imunoistoquímica (BARRA, 2006).

A região onde ocorre a o reconhecimento dos epítomos dominantes de ligação dos anticorpos (Ac) contra p53 estão localizados tanto no terminal NH₂ quanto no terminal COOH de p53 e sua fosforilação é extremamente importante para a reatividade (SOUSSI, 2000). Cerca de 50% dos tumores induzidos pelo VLB apresentam mutações em p53 (TAJIMA, 1998) e resultados positivos para imunoistoquímica usualmente são indicativos de anormalidades em p53 (SOUSSI, 2000).

Presente na membrana mitocondrial, onde é responsável por impedir o extravasamento do citocromo c, a proteína bcl-2 apresenta coloração no citoplasma embora pareça ser de membrana (BARRA, 2006). Alguns trabalhos têm tentado

mostrar a correlação entre p53 e bcl-2 através da imunoistoquímica, observando a positividade simultânea para os dois marcadores. A análise em tais marcadores busca estabelecer a relação entre estes genes e o desenvolvimento da LEB, uma vez que em linfomas o bcl-2 já parece ser importante na supressão da apoptose e o gene p53 mutado se apresentar em uma grande variedade de tumores (PEZZELA et al., 1993).

Os linfócitos T e B apresentam antígenos de superfície específicos que são o CD3 e o CD79 respectivamente. Os linfomas podem ser de células T ou B, mas o que está associado com a LEB é o linfoma de células B. Para que possam ser reconhecidas as células quanto a sua linhagem entre as duas mencionadas é necessário que seja feita a imunofenotipagem para os antígenos específicos. No presente trabalho as células da linhagem B eram as de interesse. Foi então realizada a imunoistoquímica com anticorpos específicos contra os antígenos de superfície CD3 e CD79 α . A imunomarcação predominante para CD79 α , que é o antígeno de superfície específico de linfócitos B, era esperada uma vez que a neoplasia é dessa linhagem de células. Poucos linfócitos T foram encontrados na massa tumoral. Podemos observar também que o percentual de células não marcadas possivelmente está relacionado ao estroma e células do parênquima associados aos órgãos não linfóides onde a neoplasia se encontrava, mesmo estes locais tendo sido microscopicamente escolhidos em regiões mais evidentes do tumor.

Os escores observados para p53 nas amostras de tecidos dos tumores foram bem maiores (++) que os observados no grupo controle que apresentou escore zero. O valor percentual médio observado com o respectivo desvio padrão no grupo afetado foi de $55,95 \pm 7,07$. A proteína p53 em tecidos normais não é observada devido a sua meia

vida curta. Em processos neoplásicos, pode torna-se possível sua detecção pelo processo de imunoistoquímica, uma vez que a meia vida de p53 freqüentemente se apresenta aumentada. O aumento da meia vida da p53 ocorre através de estabilização principalmente por processo de fosforilação e acetilação o que proporciona seu acúmulo nuclear (OTTAGGIO et al., 2000). Esse acúmulo é visualizado como grânulos marrom-escuros no núcleo (TEIFKE; LOHR, 1996).

As mutações em p53 promovidas por mudança conformacional, formação de complexos com oncoproteínas virais e expressão anormal do gene devido a alterações de fatores de transcrição nuclear são os principais mecanismos associados ao acúmulo nuclear da proteína (BENNETT et al., 1992). Infecções virais podem promover todas estas alterações o que corrobora com a idéia proposta por este trabalho.

As mutações do tipo missense foram as principais encontradas, no gene p53, em um estudo feito com animais infectados com o VLB. Embora estas alterações direcionem o seu envolvimento na leucemogênese, seus efeitos nas funções da proteína ainda permanecem não esclarecidos (TAJIMA et al., 1998).

Os escores aumentados de bcl-2 observados nas amostras dos animais que apresentavam a LEB vêm reforçar a idéia de alteração no processo de apoptose, uma vez que o grupo controle apresentou escores significativamente menores. No grupo controle foram utilizadas as regiões da cripta do epitélio intestinal e os linfonodos que conhecidamente apresentam níveis normais de bcl-2. Essas regiões contêm células do estrato germinativo que não devem entrar em apoptose, logo a proteína antiapoptótica bcl-2 está presente (KRAJEWSKI et al., 1994) Ao contrário de p53 os escores de bcl-2 podem ser observados em tecidos normais, porém o que se espera é que estes estejam em patamares menores que os observados nos tecidos neoplásicos associados a LEB.

Esses níveis elevados de bcl-2 seria um dos mecanismos associados ao aumento da sobrevivência das células B, contribuindo desta forma para o desenvolvimento e progressão da doença. Dentre os mecanismos associados à progressão da doença podemos citar também a correlação entre a resposta imune celular às células infectadas pelo VLB. O reconhecimento dos antígenos do vírus pelos linfócitos T parece desempenhar um papel importante na progressão da doença, podendo atrasar a mesma (KABEYA; OHASHI; ONUMA, 2001). Como o retrovírus da LEB se integra ao DNA da célula hospedeira seu reconhecimento pelo sistema imune pode ficar prejudicado e desta forma as células infectadas não serão combatidas, proporcionando sua infecção crônica. Essa cronicidade é essencial ao desenvolvimento tumoral. Na leucemia linfocítica crônica, que acomete humanos, está associado um mecanismo de ação similar ao da LEB, onde os mecanismos de apoptose estão envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença. O envolvimento de um retrovírus similar ao da LEB que também promove neoplasias, sugere que o estudo dos mecanismos carcinogênicos da LEB pode vir a ser um bom modelo para o desenvolvimento de pesquisa para a espécie humana (GILLET et al., 2007). Alguns trabalhos têm estudado a possível correlação que a presença de DNA de retrovírus não integrado ao DNA do hospedeiro teria com a progressão da LEB, da leucemia de células T e AIDS, três doenças causadas por retrovírus do mesmo grupo. Os resultados sugeririam que assim como na AIDS, a restrição da integração do vírus ao DNA do hospedeiro promove um longo período de latência como o observado na LEB (REYES; COCKERELL, 1998).

Considerações Finais

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A desordem proliferativa das neoplasias pode ter origem tanto no aumento da proliferação quanto na supressão da morte celular. O presente trabalho se propôs estudar a expressão de duas das principais proteínas envolvidas na apoptose. Os resultados nos permitiram concluir que os escores aumentados das proteínas p53 e bcl-2 avaliados através da técnica de imunoistoquímica podem ser um dos responsáveis pelo processo de linfomagênese. Os mecanismos associados ao acúmulo das proteínas estudadas seria a inibição do processo de apoptose que viria a contribuir para o aumento do tempo de sobrevivência das células e a perda da estabilidade genômica promovida pelo gene p53 inativo, um fator contribuinte para o desenvolvimento e progressão tumoral. O aumento no tempo de sobrevivência das células causaria um desequilíbrio entre a proliferação e morte celular promovendo crescimento anormal no tecido linfóide infectado. Os escores aumentados das proteínas p53 e bcl-2 vêm corroborar o que outros trabalhos de genômica já haviam predito, confirmando o envolvimento destes genes no processo de leucemogênese da Leucose Enzoótica Bovina.

Conclusão

9 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Detectou-se marcação para CD79 em linfócitos neoplásicos.
- Há pouca infiltração de CD3 na massa tumoral.
- Os escores da proteína bcl2, avaliados neste trabalho através da técnica de imunoistoquímica, estão aumentados.
- Foi detectada a imunomarcação de p53 nos animais afetados.
- A alteração na expressão destes genes pode estar relacionada a linfomagênese da Leucose Enzoótica Bovina.

Referências

REFERÊNCIAS

- ACAITE, J.; TAMOSIUNAS, V.; LUKAUSKAS, K.; MILIUS, J.; PIESKUS, J. The Eradication experience of enzootic leukosis from Lithuania. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 4, p. 139-147, 2007.
- AKGUL, C.; MOULDING, D. A.; EDWARDS, S. W. Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 61, p. 2189-2199, 2004.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, R. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: ARTMED EDITORA S.A., 2006.
- AQUINO, S. M.; HAMOR, R. E.; VALLI, V. E.; KITCHELL, B. E.; TUNEV, S. S.; BAILEY, K. L.; EHRHART, E. J. Progression of an orbital T-cell rich B-cell lymphoma to a B-cell lymphoma in a dog. **Veterinary Pathology**, v. 37, n. 5, p. 465-469, 2000.
- BARRA, M. O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Revista da AMRIGS**, v. 50, n. 2, p. 173-184, 2006.
- BARON, S. **Medical microbiology**. Galveston: University of Texas Medical Branch, 1996.
- BARROS, C. S. L.; Leucose Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças de ruminantes e equídeos**. Pelotas: Fervor Editora, 2007. p.159-169.
- BENNETT, W. P.; HOLISTEIN, M. C.; METCLF, R. A.; WELSH, J. A.; HE, A.; SI-MM ZHU; KUSTERS, I.; RESAU, J. H.; TRUMP, B. F.; LANE, D. P.; HARRIS, C. C. p53 Mutation and protein accumulation during multistage human esophageal carcinogenesis. **Cancer Research**, Bethesda, v. 52, p. 6092-9097, 1992.
- BLOOD, D. C.; RADOSTITS, O. M.; ARUNDEL, J. H.; GAY, C. C. **Clínica veterinária**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1991. p. 684-691.
- BODE, A. M.; DONG, Z. Post-Translational modification of p53 in tumorigenesis. **Nature Reviews**, v. 4, p. 793-805, 2004.
- CAULIN, C.; NGUYEN, T.; LANG, G. A.; GOEPFERT, G. M.; BRINKLEY, B. R.; KAI, W.; LOZANO, G.; ROOP, D. An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain- and loss-of-function *p53* mutations. **The journal of Clinical Investigation**, Philadelphia, v. 117, n. 7, p. 1893-1901, 2007.
- COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, H. E. **Retroviruses**. New York: Cold Print Harbor Laboratory Press, 1997.
- CORDONE, I.; MASI, S.; MAURO, F. R.; SODDU, S.; MORSILLI, O.; VALENTINI, T.; VEGNA, M. L.; GUGLIELMI, C.; MANCINI, F.; GIULIACCI, S.; SACCHI, A.

MANDELLI, F.; FOA, R. p53 Expression in B-Cell chronic lymphocytic leukemia: a marker of disease progression and poor prognosis. **Blood**, v. 91, n.11, p. 4342-4349, 1998.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patología estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Editora Guianabara Koogan S.A., 2000.

DEES, C.; GODFREY, V. L.; SCHULTZ, R. D.; TRAVIS, C. C. Wild type p53 reduces the size of tumors caused by bovine leukemia virus-infected cells. **Cancer Letters**, v. 101, p. 115-122, 1996.

DEL FAVA, C.; PITUCO, E. M. Infecção pelo vírus da leucemia bovina (BLV) no Brasil. **Biológico**, v. 66, n. 1/2, p. 1-8, 2004.

FRY, M. M.; MCGAVIN, M. D. Bone marrow, blood cells and lymphatic system. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**. St. Louis: Ed. Mosby Elsevier, p. 743-780, 2007.

FUTREAL, P. A.; BARRET, J. C.; WISEMAN, R. W. An Alupolymorphism intragenic to the TP53 gene. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, n. 24, p. 6977, 1991.

GAITONDE, S. V.; RILEY, J. R.; QIA, D.; MARTINEZ, J. D. Conformational phenotype of p53 is linked to nuclear translocation. **Oncogene**, v. 19, p. 4042-4049, 2000.

GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUS, M.; BURTEAU, C.; NIGRO, A.; VANDERMEERS, F.; BALON, H.; BOUZAR, A. B.; BEFOICHE, J.; BURNY, A.; REICHERT, M.; KETTMAN, R.; WILLEMS, L. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, v. 4, n.18, p. 4-18, 2007.

HONG, S.; PUSAPATI, S. V.; POWERS, J. T.; JOHNSON, D. G. Oncogenes and the DNA Damage Response: Myc and E2F1 Engage the ATM Signaling Pathway to Activate p53 and Induce Apoptosis. **Cell Cycle**, v. 5, n. 8, p. 801-803, 2006.

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. p53 Biological network: At the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. **Journal of Nippon Medical School**, v. 73, n. 2, p. 54-64, 2006.

IKEDA, M.; KONNAI, S.; ONUMA, M.; ISHIGURO, N.; GORYO, M.; OKADA, K. Immunohistochemical analysis of expressions patterns of tumor necrosis factor receptors on lymphoma cells In enzootic bovine leukosis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 4, p. 425-432, 2005.

ISHIGURO, N.; FURUOKA, H.; MATSUI, T.; HORIUCHI, M.; SHINAGAWA, N.; ASAHINA, M.; OKADA, K. p53 mutation as a potential cellular factor for tumor development in enzootic bovine leukosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 55, p. 351-358, 1997.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Immunobiology**. New York: Garland Science, 2001.

JOHNSON, A. S.; COUTO, C. G.; WEGHORST, C. M. Mutation of the *p53* tumor suppressor gene in spontaneously occurring osteosarcomas of the dog. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 1, p. 213–217, 1998.

JOHNSON, E. S.; GRISWOLD, C. M.; Oncogenic retroviruses of cattle, chickens and turkeys: potential infectivity and oncogenicity for humans. **Medical Hypotheses**, v. 46, n. 4, p. 354-356, 1996.

KABEYA, H.; OHASHI, K.; ONUMO, M. Host Immune responses in the course of leukemia virus infection. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 7, p. 703-708, 2001.

KOMORI, H.; ISHIGURO, N.; HORIUCHI, M.; SHINAGAWA, M.; AIDA, Y. Predominant *p53* mutations in enzootic bovine leukemic cell lines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 52, n.1-2, p. 53-63, 1996.

KRAJEWSKI, S.; KRAJEWSKA, M.; SHABAIKT, A.; MIYASHITA, T.; WANG, H. G.; REED, J. C. Immunohistochemical Determination of In Vivo Distribution of Bax, a Dominant Inhibitor of Bcl-2. **American Journal of Pathology**, v. 145, n. 6, p. 1323-1336, 1994.

KUFE, D. W.; POLLOCK, R. E.; WEICHSELBAUM, R. R.; BAST, R. C., Jr.; GANSLER, T. S.; HOLLAND, J. F.; FREI III, E. **Cancer medicine**. Hamilton: BC Decker Inc, 2003.

LAI, L.; ALAVERDI, N.; MALTAIS, L.; MORSE, H. C. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 8, p. 3861-3868, 1998.

LEE, J.; KIM, Y.; KANG, C. S.; CHO, D. H.; SHIN, D. H.; YUM, Y. N.; OH, J. H.; KIM, S. H.; HWANG, M. S.; LIM, C. J.; YANG, K. H.; HAN, K. Investigation of the Bovine Leukemia Virus Proviral DNA in Human Leukemias and Lung cancers in Korea. **Journal of Korean Medical Science**, v. 20, p. 603-606, 2005.

LEITE, R. C.; LOBATO, Z. I. P.; CAMARGOS, M. F. Leucose enzoótica bovina. **Revista CFMV**, ano 10, n. 31, p. , 2004.

LEUZI, L. A. J.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Enzootic bovine leukosis and Bovine leukemia virus. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 211-221, 2001.

LEVINE, A. J. *p53*, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, p. 323-331, 1997.

LEVINE, A. J.; PERRY, M. E.; CHANG, A.; SILVER, D.; DITTMER, D.; WU, M.; WELSH, D. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of the *p53* tumour-suppressor gene in tumourigenesis. **British Journal of Cancer**, v. 69, p. 409-416, 1994.

LUNNEY, J. K.; WALKER, K.; GOLDMAN, T.; AASTED, B.; BIANCHI, A.; BINNS, R.; LICENCE, S.; BISCHOF, R.; BRANDOM, M.; BLECHA, F. Overview of the first International Workshop to define swine leukocyte cluster of differentiation (CD) antigens. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 43, n. 1-3, p. 193-206, 1994.

MANION, M. K.; HOCKENBERY, D. M. Targeting Bcl-2 related protein in cancer therapy. **Cancer Biology & Therapy**, Philadelphia, v. 2, n. 4, p. 105-114, 2003, supplementum 1.

MARTIN, N. H. The immunoglobulins: a review. **Journal of Clinical Pathology**, v. 22, n. 2, p. 117-131, 1969.

MASON, D. Y.; CORDELL, J. L.; BROWN, M. H.; BORST, J.; JONES, M.; PULFORD, K.; JAFFE, E.; RALFKIAER, E.; DALLENBACH, F.; STEIN, H.; PILERI, S.; GATTER, K. C. CD79 α a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. **The American Society of Hematology**, v. 86, n. 4, p. 1453-1459, 1995.

MELHEM, M. F.; JAW, J. C.; EL-ASHMAWY, L.; JOHNSON, J. T.; LANDRENEAU, R. J.; SRIVASTAVA, S.; QHITESIDE, T. L. Assessment of sensitivity and specificity of immunohistochemical staining of p53 in lung and head and neck cancers. **The American Journal of Pathology**, v. 46, n. 5, p. 1170-1177, 1995.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary virology**. San Diego: Academic Press, 1999.

NUOTIO, L.; RUSANEN, H.; SIHVONEN, L.; NEUVONEN, E. Eradication of enzootic leukosis from Finland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, p. 43-49, 2003.

OTTAGGIO, L.; BOZZO, S.; MORO, F.; SPARKS, A.; CAMPOMENOSI, P.; MIELE, M.; BONATTI, S.; FRONZA, G.; LANE, D. P.; ABBONDANDOLO, A. Defective nuclear localization of p53 protein in Chinese hamster cell line is associated with the formation of stable cytoplasmic protein multimers in cells with gene amplification. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 9, p. 1631-1638, 2000.

PATTINGRE, S.; LEVINE, B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? **Cancer Research**, Bethesda, v. 66, n. 6, p. 2885-2888, 2006.

PEZZELLA, M.; MORRISON, H.; JONES, M.; GATTER, K. C.; LANE, D.; HARRIS, A. L.; MASON, D. Y. Immunohistochemical detection of p53 and bcl-2 proteins in non-Hodgkin's lymphoma. **Histopathology**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 1993.

PINK, J. R. L.; BUTTERY, S. H.; DE VRIEST, V. M.; MILSTEIN, C. Human Immunoglobulin Subclasses: Partial Amino Acids Sequence of the constant Region of a γ 4 Chain. **Biochemical Journal**, v. 117, n. 1, p. 33-47, 1970.

REBHUM, W. C.; GUARD, C. **Doenças do gado leiteiro**. São Paulo: Ed. Roca, 2000, p. 596-605.

REYES, R. A.; COCKERELL, G. L.; Increased ratio of bcl-2/bax expression is associated with bovine leukemia virus-induced leukemogenesis in cattle. **Virology**, v. 242, p. 184-192, 1998.

SCHMITT, E.; PAQUET, C.; BEAUCHEMIN, M.; BERTRAND, R. DNA-damage response network at the crossroads of the cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. **Journal of Zhejiang University**, Hangzhou, v. 8, n. 6, p. 377-397, 2007.

SCHWARTZ-CORNIL, I.; CHEVALLIER, N.; BELLOC, C.; LE RHUN, D.; LAINÉ, V.; BERTHELEMY, M.; MATEO, A.; LEVI, D. Bovine leukemia virus-induced lymphocytosis in sheep is associated with reduction of spontaneous B cell apoptosis. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 153-162, 1997.

SOUSSI, T. p53 Antibodies in sera of patients with various types of cancer: A Review. **Cancer Research**, v. 60, p. 1777-1788, 200.

STONE, D. M.; NORTON, L. K.; DAVIS, W. C. Spontaneously proliferating lymphocytes from bovine leukaemia virus-infected, lymphocytotic cattle are not the virus-expressing lymphocytes, as these cells are delayed in G₀/G₁ of the cell cycle and are spared from apoptosis. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 971-981, 2000.

TAJIMA, S.; ZHUANG, W. Z.; KATO, M. V.; OKADA, K.; IKAWA, Y.; AIDA, Y. Function and Conformation of Wild-type p53 Protein are Influenced by Mutations in Bovine Leukemia Virus-Induced B-Cell Lymphosarcoma. **Virology**, v. 243, p. 235-246, 1998.

TAKAHASHI, M.; TAJIMA, S.; OKADA, K.; DAVIS, W. C.; AIDA, Y. Involvement of bovine leukemia virus in induction and inhibition of apoptosis. **Microbes and Infection**, v. 7, p. 19-28, 2005.

TEIFKE, J. P.; LOHR, C. V. Immunohistochemical detection of P53 overexpression in paraffin wax-embedded squamous cells carcinomas of cattle, horses, cats and dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v.114, p. 205-210, 1996.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed., Ed. Manole, São Paulo, 1997, p.1027-1062.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology**: an introduction. Philadelphia: Saunders, 2004.

TOMADAKI, H.; SCORILAS, A. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, London, v. 43, n. 1, p. 1-67, 2006.

TOSTES, R. A.; Situação da leucose bovina no Brasil: uma revisão. **Colloquium Agrariae**, v.1, n.1, p. 42-50, 2005.

VALENTINE, B. A.; McDONOUGH, S. A. B-cell leukemia in a sheep. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 117-119, 2003.

VERNAU, W.; JACOBS, R. M.; VALLI, V. E. O.; HEENEY, J. L. The immunophenotypic characterization of bovine lymphomas. **Veterinary Pathology**, v. 34, p. 9222-9225, 1997.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. **Nature**, London, v. 408, n. 16, p. 307-310, 2000.

WELSH, J. A.; CASTRÉN, K.; VAHAKANGAS, K. H. Single-strand conformation polymorphism analysis to detect p53 mutations: characterization and development of controls. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 43, n. 12, p. 2251-2255, 1997.

WILLEMS, L.; BURNY, A.; COLLETE, D.; DANGOISSE, O.; DEQUIEDT, F.; GATOT, J.S.; KERKHOF, P.; LEFÈVRE, L.; MEREZAK, C.; PEREMANS, T.; PORTETELLE, D.; TWIZERE, J. C.; KETTMANN, R. Genetic Determinants of Bovine Leukemia Virus Pathogenesis. **Aids Research and Human Retroviruses**, v.16, n. 16, p. 1787-1795, 2000.

WILLIS, A. C.; CHEN, X. The Promise and obstacle of p53 as a cancer therapeutic agent. **Current Molecular Medicine**, Oak Park, v. 2, n. 4, p. 329-345, 2002.

YIN, S.; MAKARA, M.; PAN, T.; ISHIGURO, H.; IKEDA, M.; NUMAKUNAI, S.; GORYO, M.; OKADA, K. Relation between Phenotype of Tumor Cells and Clinicopathology in Bovine Leukosis, **Pathology**, Sydney, v. 65, n. 5, p. 599-606, 2003.

YOUNG, L. S.; DAWSON, C. W.; ELIOPOULOS, A. G. Viruses and apoptosis. **British Medical Bulletin**, v. 53, n. 3, p. 509-521, 1997.

ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 1939-1945, 2006.

ZINKEL, S.; GROSS, A.; YANG, E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. **Cell Death and Differentiation**, v.13, p. 1351-1359, 2006.

Anexos

Figura 1 – Linfonodo, imunomarcção positiva para CD79, confirmando o fenótipo de linfócitos B neoplásicos. Anti CD79, Hematoxilina de Harris. Escala em barra 25µm

Figura 2 – Linfonodo, imunomarcção positiva para CD3, mostrando pequena quantidade para linfócitos T infiltrados na massa tumoral. Anti CD3, Hematoxilina de Harris. Seta: Linfócito T marcado. Escala em barra 25µm

Figura 3 – Linfonodo, imunomarcção positiva para p53 em núcleo e em citoplasma de linfócitos neoplásicos. Anti p53, Hematoxilina de Harris. Escala em barra 25µm

Figura 4 – Linfonodo, imunomarcção positiva para bcl-2 em linfócitos neoplásicos. Anti bcl-2, Hematoxilina de Harris. Escala em barra 25µm