MAIARA GARCIA BLAGITZ

Avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas
naturalmente infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos

São Paulo
2011

MAIARA GARCIA BLAGITZ

Avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas
naturalmente infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Prof^ª Dr^ª Alice Maria Melville Paiva Della Libera

São Paulo
2011

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.2413
FMVZ

Blagitz, Maiara Garcia

Avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos / Maiara Garcia Blagitz. -- 2011.

161 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2011.

Programa de pós-graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera.

1. Bovinos. 2. Células fagocíticas. 3. Glândula mamária. 3. Leucose enzoótica dos bovinos. I. Título.

ERRATA

BLAGITZ, M. G. **Avaliação funcional de fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose bovina.** [Functional evaluation of blood and milk phagocytes of cows naturally infected by bovine leukosis virus] 2011. 161p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Folha	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	Título	Vírus da leucose bovina	Vírus da leucose dos bovinos
Abstract	Título	Vírus da leucose bovina	Vírus da leucose dos bovinos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação funcional de fagócitos séricos e lácteos de vacas naturalmente infectados pelo vírus da leucose dos bovinos", utilizando 100 (cem) bovinos, protocolado sob o nº1685/2009, sob a responsabilidade da Profa Dra Alice Maria Melville Paiva Della Libera, 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 em reunião de 01/07/09.

We certify that the Research "Functional evaluation of blood and milk phagocytes of cows naturally infected by bovine leucosis virus", utilizing 100 (one hundred) bovine, protocol number 1685/2009, under the responsibility Profa Dra Alice Maria Melville Paiva Della Libera, 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 in the meeting of day 07/01/09.

São Paulo, 13 de julho de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BLAGITZ, M. G.

Título: Avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

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

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

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

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

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

“A vitória vem de uma vontade de fazer tudo certo, do início ao fim, de não se permitir errar, mas de dar de si o máximo absoluto”

Ayrton Senna

*Aos meus pais, Edison e Maria Luiza, minha
irmã Melissa, e meus sobrinhos, Tomas e Letícia,
minha verdadeira razão de viver, com todo o
meu amor...*

*A minha mãe científica, Alice, que sempre
permaneceu ao meu lado, nos bons e maus
momentos, que sonhou junto comigo e
acreditou....*

*Ao meu namorado Fernando, que participou e
dividiu todos os momentos de angústia e de
felicidade na concretização do elefante branco...*

*Aos meus saudosos avós, minha avó, meus tios,
tias, primos e primas,*

porque família é tudo de bom!!

Agradecimentos

A Deus,

Obrigada Senhor pela minha vitória. Ser imatura, imperfeita, marcada pela fraqueza é bom. Sendo fraca sou forte e reconhecendo a minha fraqueza, volto-me para verdadeira força que emana do alto. Aprendi a ter fé e a acreditar que o melhor estava por vir. Acreditei e não fui desamparada.

Aos meus pais, Edison e Maria Luiza,

Sou muito grata por tê-los em minha vida,

Muito obrigada por todo amor, carinho, apoio e compreensão durante todos estes anos...

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Alice Maria Melville Paiva Della Libera,

Meu exemplo de vida, de profissional, de mulher, de mãe, de filha, um ser humano exemplar.

Muito obrigada por todo carinho, companhia, sinceridade, respeito, confiança, enfim, pela sua presença e por todo amor de mãe em mim depositado. Jamais esquecerei.

Sem a sua dedicação, a realização deste trabalho não seria possível....

Ao meu namorado Fernando,

Você foi presença em minha solidão, respeitou profundamente a minha maneira de ser. A sua companhia, o seu sorriso, as suas palavras mesmo a sua ausência foram expressões de amor profundo. Muito obrigada por todas as vezes que você me ouviu e deu o seu apoio. No mérito da minha conquista há muito de sua presença.

À querida amiga Andréa Cristina Parra,

Muito obrigada por tudo! Sua companhia foi fundamental do começo ao fim. O seu bom humor nunca acaba assim como as olheiras...A sua energia positiva foi inspiradora e fundamental para toda equipe durante as noites no laboratório....

À nossa família Della Libera et al.,

Milton Ricardo Azedo, Fernando Nogueira de Souza, Camila Freitas Batista, Bruna Parapinski dos Santos, Andréa Cristina Parra, Cláudia Regina Stricagnolo, Rebecca Bastos Pessoa, Raphael Schneider Vianna, Gabriel Garone de Lucca e Daniel pessoas tão diferentes e tão especiais, agradeço a todos vocês o carinho, o apoio, a dedicação, a compreensão e a torcida e durante todos estes anos. Sem a ajuda de vocês nada teria sido possível...

Ao querido sexteto lácteo,

Fernando Nogueira de Souza, Luis Fernando Fernandes de Azevedo, Camila Freitas Batista, Bruna Parapinski dos Santos e Andrea Cristina Parra, vocês foram essenciais. Muito obrigada pela companhia, pelas nossas risadas e por terem transformado os nossos momentos de cansaço em momentos tão especiais que jamais serão esquecidos.

À Dra. Andreia O. Latorre,

Muito obrigada pelo seu carinho, ensinamento, apoio e dedicação nos momentos mais difíceis. A sua atenção foi fundamental na execução deste estudo, desde a montagem dos protocolos até as análises dos resultados. Muito obrigada por tudo!

*A Priscilla Anne Melville,
Sempre presente e pronta para nos socorrer.
Agradeço o seu carinho, apoio e a sua dedicação na análise das amostras do exame bacteriológico.*

*Ao Professor Dr. Nilson Roberti Benites,
Obrigada pela sua colaboração, ajuda, apoio e torcida e pela sua presença durante todos esses anos, sendo fundamental para a minha formação profissional e pessoal.*

*A amiga e Profa. Dra. Viviani Gomes,
Companheira de muitos anos..., foi minha professora na graduação e hoje minha grande amiga. Muito obrigada pela sua torcida e amizade. A sua ajuda foi de extrema importância para as finalizações!!*

*Aos funcionários da Fazenda São Caetano,
Suzana Maria Lima, Jorge Antônio Rosa e José Roberto
Muito obrigada por ter nos acolhido e pela ajuda durante as colheitas.*

*À funcionária da administração do Hovet, Janilda,
Muito obrigada pela sua atenção durante as viagens a Pirassununga...*

*Ubiraem Mario Schalch,
Muito obrigada por ajudar a encontrar a fazenda ideal....*

*As técnicas dos laboratórios,
Clara Satsuki Mori, Marly Elizabete Ferreira de Castro e Carmen Silvia Ribeiro,
Pela ajuda em todos os momentos*

*À técnica do laboratório de imunodiagnóstico Claudia Regina Stricagnolo,
Muito obrigada pela sua ajuda e disposição durante todos estes anos....*

*A secretária da pós-graduação do departamento,
Adelaide Fátima de Jesus Borges, pela ajuda com disposição e boa vontade.*

As secretárias,

Maria Aparecida de Freitas, Silvana Rossi Guedes e Carolina Alais Aroma por todo o carinho e por toda ajuda.

Aos Professores do departamento,

Archivaldo Reche Junior, Carla Bargi Belli, Carlos Eduardo Larsson, Cássio Xavier de Mendonça Junior, Denise Saretta Schwartz, Enrico Luppi Ortolani, Fábio Celidônio Pogliani, Fernando José Benesi, Lillian Gregory, Márcia Mery Kogika, Maria Helena Akao Larsson, Maria Cláudia Araripe Sucupira, Mitika Kuribayashi Hagiwara, Raquel Yvonne Arantes Baccarin, Sílvia Regina Ricci Lucas, Viviani Gomes, Wanderley Pereira de Araújo (in memoriam), Wilson Roberto Fernandes. Agradeço pela convivência e pela torcida....

Às minhas amigas do coração,

Fabiana, Fernanda, Jéssyca e Patrícia

O tempo e a distância jamais apagarão as lembranças....mesmo com a distância, vocês souberam compreender com muito carinho a minha ausência durante estes anos. Obrigada pelo apoio e torcida!

Aos meus tios, tias, primos e primas,

Perdão pelos momentos de ausência. Obrigada pela torcida e pelo apoio.

À minha querida avó,

Maria Aparecida Vêscio Garica, por todo o carinho...

À minha querida tia e madrinha Marini,

Muito obrigada pela sua ligação direta com o céu....As suas orações foram fundamentais na concretização desta etapa.

Agradeço aos que contribuíram para o meu êxito, em especial aos residentes, funcionários da biblioteca e funcionários da Universidade de São Paulo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP),

Pelos auxílios financiamentos de bolsa (Processo n. 2007/51203-8) e de auxílio à pesquisa (2009/50672-0) que me possibilitaram uma maior tranquilidade na realização deste trabalho.

RESUMO

BLAGITZ, M. G. **Avaliação funcional de fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose bovina.** [Functional evaluation of blood and milk phagocytes of cows naturally infected by bovine leukosis virus] 2011. 161p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O vírus da leucose enzoótica bovina (VLEB) pode interferir na proporção e na funcionalidade dos linfócitos B e das demais células sanguíneas. Acreditando-se que essas alterações pudessem interferir nos mecanismos de defesa da glândula mamária, o presente estudo avaliou funcionalmente os fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas naturalmente infectadas pelo VLEB, por meio da expressão de diferentes receptores de superfície celular de fagócitos e linfócitos; da morte celular dos fagócitos e do linfócito B; pelo potencial de fagocitose e produção intracelular de peróxido de hidrogênio pelas células CD14⁺ e CH138⁺. Foram selecionadas nove vacas negativas para a LEB (grupo negativo), dez positivas sem linfocitose (grupo AL) e seis positivas com linfocitose persistente (grupo LP). Independente do perfil hematológico das vacas positivas para a LEB, nas amostras de sangue foram observadas menor expressão de células mononucleares CD14⁺, de linfócitos T (CD3⁺) e de linfócitos B CD21⁺ CD11b⁺ e maior expressão de linfócitos B (CD21⁺). As vacas do grupo LP apresentaram menores quantidades de linfócitos T auxiliares (CD3⁺ CD4⁺) e de linfócitos B CD21⁺ CD5⁻ CD11b⁻ e maiores quantidades de linfócitos B CD21⁺ CD5⁺ CD11b⁺. Menores quantidades de linfócitos B CD21⁺ CD5⁺ foram observados nas vacas do grupo AL do que nas vacas do grupo negativo. As vacas do grupo LP apresentaram menores índices de fagocitose por *Escherichia coli* pelas células mononucleares CD14⁺, menor produção de peróxido de hidrogênio e menores índices de fagocitose por *Staphylococcus aureus* pelas células polimorfonucleares CH138⁺. As vacas do grupo LP apresentaram menores índices de necrose, de apoptose e/ou necrose e maior viabilidade das células mononucleares CD14⁺, das células polimorfonucleares CH138⁺ e dos linfócitos B (CD21⁺). Apenas os linfócitos B (CD21⁺) das vacas do grupo LP apresentaram menores índices de morte por apoptose, e as células mononucleares CD14⁺ das vacas do grupo AL manifestaram maiores índices de apoptose e/ou necrose do que as vacas negativas. Independente do perfil hematológico das vacas, nas amostras de leite foram observadas maiores quantidades de macrófagos e maiores expressões de linfócitos T (CD3⁺) e de linfócitos B (CD21⁺). As vacas do grupo AL apresentaram maior quantidade de linfócitos B (CD21⁺) do que as vacas negativas. As vacas do grupo LP apresentaram menores quantidades de linfócitos T citotóxicos (CD3⁺ CD8⁺), de

linfócitos B CD21⁺ CD11b⁺ e de linfócitos B CD21⁺ CD5⁺ CD11b⁺ e maior quantidade de linfócitos B CD21⁺ CD5⁻ CD11b⁻. As vacas do grupo AL apresentaram menores índices de fagocitose por *Escherichia coli* pelos macrófagos CD14⁺ e pelos leucócitos CH138⁺ e as vacas do grupo LP apresentaram maior produção de peróxido de hidrogênio intracelular. As vacas positivas para LEB apresentaram maiores índices de morte por necrose dos macrófagos CD14⁺ e dos linfócitos B (CD21⁺) e menores índices de morte por apoptose dos macrófagos CD14⁺, dos leucócitos CH138⁺ e dos linfócitos B (CD21⁺). Estas vacas também apresentaram maior viabilidade dos macrófagos CD14⁺ e dos leucócitos CH138⁺. As vacas do grupo LP apresentaram maiores índices de apoptose e/ou necrose dos macrófagos CD14⁺, de necrose de leucócitos CH138⁺ e de viabilidade de linfócitos B (CD21⁺). Resultados permitem concluir que a o VLEB altera a resposta imune da glândula mamária.

Palavras-chave: Bovinos. Células fagocíticas. Glândula mamária. Leucose enzoótica dos bovinos.

ABSTRACT

BLAGITZ, M. G. **Functional evaluation of blood and milk phagocytes of cows naturally infected by bovine leukosis virus.** [Avaliação funcional de fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose bovina] 2011. 161p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The enzootic bovine leukemia virus (BLV) can influence the amount of lymphocytes B and other blood cells and their functions. Believing that these changes could interfere in the defense mechanisms of the mammary gland, this study evaluated blood and milk phagocytes functions from cows naturally infected VLEB through the expression of different cell surface receptors of phagocytes and lymphocytes; from death cell of phagocytes and B lymphocytes; the phagocytosis and intracellular production of hydrogen peroxide by CD14+ and CH138+ cells. We chose nine cows negative for the LEB (negative group), ten positive without lymphocytosis (LA group) and six positive with persistent lymphocytosis (LP group). In blood samples of positive cows for BLV, it was observed smaller expression of CD14+ mononuclear, T lymphocytes (CD3+) and CD21+ CD11b+ B lymphocytes, along with increased expression of B lymphocytes (CD21+). Cows of the LP group had lower amounts of T helper lymphocytes (CD3+ CD4+) and CD21+ CD5- CD11b- B lymphocytes and higher amounts of CD21+ CD5+ CD11b+ B lymphocytes. In cows of AL group it was observed lower amounts of CD21+ CD5+ B lymphocytes than in cows of negative group. Cows of LP group had lower rates of *Escherichia coli* phagocytosis by CD14+ mononuclear cells, lower intracellular production of hydrogen peroxide and lower rates of phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by CH138+ polymorphonuclear cells. Cows of LP group showed less necrosis, apoptosis and/or necrosis and increased viability of CD14+ mononuclear cells, CH138+ polymorphonuclear cells and B lymphocytes (CD21+). Only the B-lymphocytes (CD21+) of the cows in the LP group showed less apoptosis, and CD14 + mononuclear cells from cows in the AL group showed higher rates of apoptosis and/or necrosis than the ones from negative cows. In the milk sample, the positive cows showed higher amounts of macrophages and increased expression of T lymphocytes (CD3+) and B lymphocytes (CD21+). Cows of AL group showed a higher amount of B lymphocytes (CD21+) than negative cows. Cows of LP group had lower amounts of T cytotoxic lymphocytes (CD3+, CD8+), CD21+ CD11b+ B lymphocytes and CD21+, CD5+, CD11b+, B lymphocytes and increased amount of CD21 + CD5- CD11b- B lymphocytes. Cows of the AL group had lower rates of *Escherichia coli* phagocytosis by CD14+ macrophages and CH138+ leukocytes and

cows of group LP had higher production of intracellular hydrogen peroxide. The positive cows for LEB had higher rates of death by necrosis of CD14+ macrophages and B lymphocytes (CD21+) and lower rates of apoptosis of CD14+ macrophages, CH138+ leukocytes and B lymphocytes (CD21+). These cows also had higher viability of CD14+ macrophages and CH138+ leukocytes. Cows on the LP group had higher rates of apoptosis and/or necrosis of CD14+ macrophages, necrosis of CH138+ leukocytes and viability of B lymphocytes (CD21+). Results suggested that the VLEB influence the immune response of the mammary gland.

Keywords: Cattle. Phagocytic cells. Mammary gland. Enzootic bovine leukosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e dos linfócitos das amostras positivas e negativas para LEB obtidas na primeira e segunda triagem – São Paulo – 2011.....	64
Tabela 2 -	Valores das médias, dos desvios-padrões, das medianas e dos valores mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e dos linfócitos das amostras de sangue das vacas utilizadas no experimento – São Paulo – 2011.....	65
Tabela 3 -	Valores percentuais do Exame do Fundo Escuro, Exame do CMT, do Exame bacteriológico e os valores das Médias, dos desvios padrão, das medianas, e dos valores mínimo e máximo da CCS automática em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2011.....	67
Tabela 4 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativos das células mononucleares CD14+ das amostras de sangue – São Paulo – 2011.....	68
Tabela 5 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células mononucleares CD14+ das amostras de leite – São Paulo – 2011.....	69
Tabela 6 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativos das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ do leite em relação aos grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	72
Tabela 7 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células mononucleares CD14+ do sangue que produziram peróxido de hidrogênio intracelular nos diferentes grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	76
Tabela 8 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo dos macrófagos CD14+ do leite que produziram peróxido de hidrogênio intracelular nos diferentes grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	77
Tabela 9 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ das amostras de leite que produziram peróxido de hidrogênio intracelular entre os diferentes grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	80
Tabela 10 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ do leite que fagocitaram SaPI – São Paulo – 2011	84

Tabela 11 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ do leite que fagocitaram a <i>E.coli</i> nos diferentes grupos de LEB – São Paulo – 2011.....	87
Tabela 12 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ das amostras de leite que fagocitaram a SaPI entre os diferentes grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	91
Tabela 13 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ do leite que fagocitaram <i>E.coli</i> entre os grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	94
Tabela 14 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo da morte das células mononucleares CD14+ do sangue entre os grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	98
Tabela 15 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo dos macrófagos CD14+ das amostras de leite entre os grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	100
Tabela 16 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativos da morte celular das células polimorfonucleares CH138+ das amostras do sangue nos diferentes grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	104
Tabela 17 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo da morte celular dos leucócitos CH138+ das amostras de leite nos diferentes grupos experimentais – São Paulo – 2011	105
Tabela 18 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas, do mínimo e máximo dos linfócitos T (CD3+), linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) e dos linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) das amostras de sangue e de leite, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2011.....	109
Tabela 19 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e do mínimo e máximo dos linfócitos B (CD21+), linfócitos B (CD21+ CD5+) e da subunidade da β_2 – integrina (CD21+ CD11b+) das amostras de sangue, em relação aos grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	114
Tabela 20 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e do mínimo e máximo dos linfócitos B (CD21+), linfócitos B (CD21+ CD5+) e da subunidade da β_2 – integrina (CD21+ CD11b) das amostras de leite, em relação aos grupos de LEB – São Paulo – 2011.....	116

Tabela 21 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo da morte celular dos linfócitos B (CD21+) das amostras do sangue nos grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	120
Tabela 22 -	Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo da morte celular dos linfócitos B (CD21+) do leite nos grupos experimentais – São Paulo – 2011.....	122

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Valores das medianas das células mononucleares CD14+ e dos polimorfonucleares CH138+ do sangue – São Paulo – 2011.....	73
Gráfico 2 -	Valores das medianas dos macrófagos e dos macrófagos (CD14+) e dos leucócitos CH138+ do leite – São Paulo – 2011.....	73
Gráfico 3 -	Valores médios das células mononucleares que expressaram CD14 e das células polimorfonucleares CH138+ do sangue que produziram peróxido de hidrogênio intracelular – São Paulo – 2011.....	81
Gráfico 4 -	Valores das medianas dos macrófagos que expressaram CD14 e dos leucócitos que expressaram CH138 do leite que produziram peróxido de hidrogênio intracelular – São Paulo – 2011.....	81
Gráfico 5 -	Valores das medianas das células mononucleares CD14+ do sangue que fagocitaram SaPI e <i>E.coli</i> – São Paulo – 2011.....	88
Gráfico 6 -	Valores das medianas dos macrófagos CD14+ das amostras de leite que fagocitaram SaPI e <i>E.coli</i> – São Paulo – 2011.....	88
Gráfico 7 -	Valores médios das células polimorfonucleares CH138+ das amostras de sangue que fagocitaram SaPI e <i>E.coli</i> – São Paulo – 2011.....	95
Gráfico 8 -	Valores médios dos leucócitos CH138+ das amostras de leite que fagocitaram SaPI e <i>E.coli</i> – São Paulo – 2011.....	95
Gráfico 9 -	Valores médios das células mononucleares CD14+ das amostras de sangue que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis – São Paulo – 2011.....	99
Gráfico 10 -	Valores das medianas dos macrófagos CD14+ das amostras de leite que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis – São Paulo – 2011.....	101
Gráfico 11 -	Valores das medianas das células polimorfonucleares CH138+ das amostras de sangue que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis – São Paulo – 2011.....	105
Gráfico 12 -	Valores das medianas dos leucócitos CH138+ das amostras de leite que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis – São Paulo – 2011.....	106
Gráfico 13 -	Valores médios dos linfócitos T (CD3+), dos linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) e dos linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) das amostras de sangue – São Paulo – 2011.....	110

Gráfico 14 - Valores das medianas dos linfócitos T (CD3+), dos linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) e dos linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) das amostras de leite – São Paulo – 2011.....	110
Gráfico 15 - Valores das medianas dos linfócitos B (CD21+), dos linfócitos B (CD21+ CD5+), da subunidade da β_2 -integrina (CD21+ CD11b+), dos linfócitos B (CD21+ CD5+ CD11b+) e dos linfócitos B (CD21+ CD5- CD11b-) das amostras de sangue – São Paulo – 2011.....	115
Gráfico 16 - Valores das medianas dos linfócitos B (CD21+), dos linfócitos B (CD21+ CD5+), subunidade da β_2 – integrina (CD21+ CD11b+), dos linfócitos B (CD21+ CD5+ CD11b+) e dos linfócitos B (CD21+ CD5- CD11b-) das amostras de leite – São Paulo – 2011.....	117
Gráfico 17 - Valores médios dos linfócitos B (CD21+) das amostras de sangue que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis – São Paulo – 2011.....	121
Gráfico 18 - Valores das medianas dos linfócitos B (CD21+) das amostras de leite que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis – São Paulo – 2011.....	123

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Valores do leucograma de bovinos sadios, em número absoluto e contagem diferencial relativa utilizada como referência no presente estudo – São Paulo – 2011.....	48
Quadro 2 - Protocolo dos tubos utilizados para a calibração e tubos utilizados para o experimento, segundo conteúdo (células sanguíneas ou células da suspensão celular do leite, anticorpos monoclonais primários e secundários) para realização das quantificações das populações de leucócitos das amostras de sangue e leite no Citômetro de fluxo (FACSCalibur™ - <i>Becton Dickinson Immunocytometry System</i> ™) - São Paulo - 2011.....	55
Quadro 3 - Protocolo dos tubos de calibração e tubos de experimento, segundo conteúdo (células sanguíneas ou células da suspensão celular do leite, anticorpos monoclonais primários e secundários) para realização da quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio e de fagocitose das amostras de sangue e leite no Citômetro de fluxo (FACSCalibur™ - <i>Becton Dickinson Immunocytometry System</i> ™) – São Paulo – 2011.....	57
Quadro 4 - Protocolo dos tubos de calibração e tubos de experimento, segundo conteúdo (células sanguíneas ou células da suspensão celular do leite, anticorpos monoclonais primários e secundários) para realização da avaliação da morte celular no Citômetro de fluxo (FACSCalibur™ - <i>Becton Dickinson Immunocytometry System</i> ™) – São Paulo – 2011.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Exemplos de identificação de células mononucleares e de células mononucleares CD14+ nos leucócitos do sangue de vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	70
Figura 2 -	Exemplos de identificação da população de leucócitos, de macrófagos e de macrófagos CD14+ nas amostras de leite de vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	71
Figura 3 -	Exemplos de identificação de células polimorfonucleares e células polimorfonucleares CH138+ no sangue de vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	74
Figura 4 -	Exemplos de identificação da população de leucócitos e de leucócitos CH138+ no leite de vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	75
Figura 5 -	Exemplos de identificação de células mononucleares CD14+ do sangue de vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) que produziram peróxido de hidrogênio intracelular – São Paulo – 2011.....	78
Figura 6 -	Exemplos de identificação de macrófagos CD14+ do leite de vaca que produziram peróxido de hidrogênio intracelular, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	79
Figura 7 -	Exemplos de identificação de células polimorfonucleares CH138+ do sangue de vacas que produziram peróxido de hidrogênio intracelular, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	82
Figura 8 -	Exemplos de identificação de leucócitos CH138+ do leite de vacas que produziram peróxido de hidrogênio intracelular dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	83
Figura 9 -	Exemplos de identificação de células mononucleares CD14+ do sangue de vacas que fagocitaram SaPI, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	85
Figura 10 -	Exemplos de identificação de macrófagos CD14+ do leite de vacas que fagocitaram SaPI, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	86
Figura 11 -	Exemplos de identificação de células mononucleares CD14+ do sangue de vacas que fagocitaram <i>E.coli</i> , dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	89
Figura 12 -	Exemplos de identificação de macrófagos CD14+ do leite de vacas que fagocitaram <i>E.coli</i> , dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	90

Figura 13 -	Exemplos de identificação de células polimorfonucleares CH138+ do sangue de vacas que fagocitaram SaPI, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	92
Figura 14 -	Exemplos de identificação de leucócitos CH138+ do leite de vacas que fagocitaram SaPI, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	93
Figura 15 -	Exemplos de identificação de células polimorfonucleares (CH138+) do sangue de vacas que fagocitaram <i>E.coli</i> , dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	96
Figura 16 -	Exemplos de identificação de leucócitos CH138+ do leite de vacas que fagocitaram <i>E.coli</i> , dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	97
Figura 17 -	Exemplos de identificação de células mononucleares CD14+ do sangue de vacas que sofreram morte celular por apoptose (Q1), por apoptose e/ou necrose (Q2) e por necrose (Q3) e das células viáveis (Q4), dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	102
Figura 18 -	Exemplos de identificação de macrófagos (CD14+) do leite de vacas que sofreram morte celular por apoptose (Q1), por apoptose e/ou necrose (Q2) e por necrose (Q3) e das células viáveis (Q4), dos grupos negativo (a), AL(b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	103
Figura 19 -	Exemplos de identificação de células polimorfonucleares CH138+ do sangue de vacas que sofreram morte celular por apoptose (Q1), por apoptose e/ou necrose (Q2) e por necrose (Q3) e das células viáveis (Q4), dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	107
Figura 20 -	Exemplos de identificação de leucócitos (CH138+) do leite de vacas que sofreram morte celular por apoptose (Q1), por apoptose e/ou necrose (Q2) e por necrose (Q3) e das células viáveis (Q4), dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	108
Figura 21 -	Exemplos de identificação de linfócitos T (CD3+), linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) (Q1) e de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) (Q3) nas células mononucleares do sangue das vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	112
Figura 22 -	Exemplos de identificação da população de leucócitos, de linfócitos T (CD3+), linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) (Q1) e de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) (Q3) nos leucócitos do leite das vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	113

Figura 23 -	Exemplos de identificação de linfócitos B (CD21+), linfócitos B (CD21+ CD5+) (Q1), de linfócitos B (CD21+ CD5+ CD11b+) (Q2) e de linfócitos B (CD21+ CD11b+) (Q3) e dos linfócitos B (CD21+ CD5- CD11b-) (Q4) do sangue das vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	118
Figura 24 -	Exemplos de identificação da população de leucócitos, de linfócitos B (CD21+), linfócitos B (CD21+ CD5+) (Q1), linfócitos B (CD21+ CD5+ CD11b) (Q2), linfócitos B (CD21+ CD11b+) (Q3), e de linfócitos B (CD21+ CD5- CD11b-) (Q4) nos leucócitos do leite das vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	119
Figura 25 -	Exemplos de identificação de linfócitos B (CD21+) do sangue de vacas que sofreram morte celular por apoptose (Q1), apoptose e/ou necrose (Q2) e por necrose (Q3) e das células viáveis (Q4) dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	124
Figura 26 -	Exemplos de identificação de linfócitos B (CD21+) do leite de vacas que sofreram morte celular por apoptose (Q1), apoptose e/ou necrose (Q2) e por necrose (Q3) e das células viáveis (Q4), dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011.....	125

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	30
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	32
2.1	LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA.....	32
2.2	MAMITE.....	36
3	OBJETIVO.....	46
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1	ANIMAIS UTILIZADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	47
4.2	PRIMEIRA FASE.....	48
4.2.1	Colheita de sangue.....	48
4.2.2	Análise hematológica.....	49
4.2.3	Sorodiagnóstico.....	49
4.3	SEGUNDA FASE.....	49
4.3.1	Colheita de leite.....	50
4.3.1.1	Exame clínico da glândula mamária.....	50
4.3.1.2	Teste do fundo escuro.....	50
4.3.1.3	CMT.....	51
4.3.1.4	Contagem de células somáticas automática.....	51
4.3.1.5	Exame bacteriológico.....	51
4.3.1.6	Avaliação da celularidade.....	52
4.3.2	Colheita de sangue.....	52
4.3.3	Avaliação imunitária.....	53
4.3.3.1	Isolamento da suspensão celular das amostras de leite.....	53
4.3.3.2	Viabilidade e concentração celular das amostras de leite.....	54

4.3.3.3	Quantificações das populações de leucócitos das amostras de sangue e de leite	54
4.3.3.4	Liberção de peróxido de hidrogênio e de fagocitose.....	56
4.3.3.5	Avaliação da morte celular.....	58
4.4	ANÁLISE DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	60
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
5	RESULTADOS.....	62
5.1	ANÁLISE DESCRITIVA.....	62
5.1.1	Triagens.....	62
5.1.2	Experimento.....	63
5.1.3	Amostras de leite.....	65
5.2	AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS FAGÓCITOS DO SANGUE E DO LEITE	67
5.2.1	Populações de células mononucleares CD14+ do sangue e de macrófagos CD14+ do leite.....	68
5.2.2	Populações de células polimorfonucleares CH138+ do sangue e de leucócitos (CH138+) do leite.....	71
5.2.3	Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular das amostras do sangue e do leite.....	75
5.2.3.1	Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ do leite.....	76
5.2.3.2	Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ do leite.....	79
5.2.4	Avaliação da fagocitose das amostras do sangue e do leite.....	83
5.2.4.1	Fagocitose da SaPI pelas células mononucleares (CD14+) do sangue e pelos macrófagos (CD14+) do leite.....	83
5.2.4.2	Fagocitose da <i>E.coli</i> pelas células mononucleares CD14+ do sangue e pelos macrófagos (CD14+) do leite.....	86
5.2.4.3	Fagocitose da SaPI pelas células polimorfonucleares CH138+ do sangue e pelos leucócitos CH138+ do leite.....	90
5.2.4.4	Fagocitose da <i>E.coli</i> pelas células polimorfonucleares CH138+ do sangue e pelos leucócitos CH138+ do leite	93

5.2.5	Avaliação da morte celular dos fagócitos sanguíneos e lácteos.....	97
5.2.5.1	Morte celular das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ do leite.....	97
5.2.5.2	Morte celular das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ do leite.....	103
5.3	AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS LINFÓCITOS DO SANGUE E DO LEITE.....	108
5.3.1	Populações de linfócitos T (CD3+) do sangue e do leite.....	108
5.3.2	Populações de linfócitos B (CD21+) do sangue e do leite.....	113
5.3.3	Morte celular dos linfócitos B (CD21+) do sangue e do leite.....	120
5.4	ANÁLISE DE CORRELAÇÕES.....	125
6	DISCUSSÃO.....	126
6.1	AVALIAÇÃO DOS FAGÓCITOS SANGUÍNEOS E LÁCTEOS.....	127
6.1.1	Avaliação das populações de fagócitos mononucleares sanguíneos e lácteos	128
6.1.2	Avaliação funcional das populações de fagócitos polimorfonucleares sanguíneos e lácteos.....	134
6.2	AVALIAÇÃO DOS LINFÓCITOS SANGUÍNEOS E LÁCTEOS.....	138
6.2.1	Avaliação das populações e subpopulações de linfócitos sanguíneos e lácteo.....	138
6.2.2	Avaliação da morte dos linfócitos B sanguíneos e lácteos.....	143
6.3	ANÁLISE DE CORRELAÇÕES.....	144
7	CONCLUSÕES.....	146
	REFERENCIAS.....	147

1 INTRODUÇÃO

A leucose enzoótica dos bovinos (LEB) é uma enfermidade de origem viral, infecto-contagiosa que acomete de forma natural os bovinos e experimentalmente acomete os ovinos. É de caráter neoplásico, de evolução crônica e tem como alvo o sistema linfóide.

A LEB é causada pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos (VLB), considerado um retrovírus oncogênico exógeno (SCHWARTZ et al., 1994), pertencente ao grupo dos Deltaretrovírus (FAUQUET et al., 2004) e responsável pelo comprometimento de algumas células do sistema imunológico, principalmente dos linfócitos B (SCHWARTZ et al., 1994). O vírus se integra em lugares dispersos, ao genoma (KETTMANN et al., 1987), e está associado ao desenvolvimento de linfocitose persistente (LP) e linfossarcoma nestes animais (PARODI, 1987).

As perdas econômicas relacionadas com a LEB estão ligadas à redução da produção de leite, redução do ganho de peso, condenação de carcaças e aumento dos gastos com animais de reposição e assistência veterinária (D'ANGELINO; GARCIA; BIRGEL, 1998). Seus prejuízos também foram relacionados a outras enfermidades como a BVDV, a paratuberculose e a neosporose (TIWARI et al., 2007) e mesmo à mamite (RUSOV; MILOJEVIC; STOJANOVIC, 1994; SANDEV et al., 2004), embora estudos pretéritos não esclareçam se o vírus interfere na função das células do sistema fagocítico, precursor da maioria das respostas imunitárias.

A LEB pode ser diagnosticada por alterações hematológicas, sorodiagnóstico e pelo isolamento do agente. Atualmente as alterações hematológicas são consideradas inespecíficas (NAGY et al., 2002), o sorodiagnóstico é realizado por imunodifusão em ágar gel (IDGA) e por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e o isolamento do agente pode ser realizado pelo isolamento em cultura celular. Sua identificação é possível por técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia polimerase (PCR), responsável pela detecção direta do genoma viral (BIRGEL, 1982; DE GIUSEPPE et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 1999; MOLLOY et al., 1990; NAIF et al., 1990; REICHERT; STEC, 1999).

O provírus da LEB já foi detectado em linfócitos B do sangue periférico de bovinos e ovinos infectados (SCHWARTZ et al., 1994), entretanto, a descoberta do VLEB em células epiteliais mamárias de vacas infectadas trouxe a possibilidade do vírus alterar,

funcionalmente, estas células (BUEHRING; KRAMME; SCHULTZ, 1994). Motton e Buehring (2003) sugeriram que os efeitos da infecção pelo VLEB na produção de leite podem estar relacionados não exclusivamente aos danos à saúde geral do animal, mas também por lesões celulares, posto que encontraram um aumento nas taxas de crescimento e na longevidade de células epiteliais mamárias infectadas, com alteração na sua diferenciação normal e inibição na produção de caseína.

Apesar das já descritas interferências à resposta imune sanguínea (AZEDO et al., 2008; SOUZA, 2010) e mamária (MOTTON; BUEHRING, 2003), outro estudo, dentre os pesquisadores, comprovou diretamente os efeitos que VLEB causa às funções de células da linhagem imunitária da glândula mamária. Desta forma, possíveis variações nas subpopulações de leucócitos no leite de animais infectados pelo VLEB, poderiam comprometer os mecanismos de defesa da glândula mamária bovina. Provavelmente, o vírus compromete as subpopulações de linfócitos na defesa da glândula mamária contra a invasão de patógenos e a capacidade das células apresentadoras de antígenos também se torna crítica para o estabelecimento de imunidade efetiva contra infecções intramamárias (PARK et al., 1992, 1993; SORDILLO et al., 1991; TAYLOR et al., 1994; YAMAGUSHI et al., 1999).

Alguns autores avaliaram possíveis alterações celulares no leite de animais infectados pelo VLEB, contudo, os resultados foram inconsistentes. Assim, enquanto Langston et al. (1978) não observaram diferenças significativas na contagem de células somáticas (CCS) no leite de vacas infectadas, D'Angelino, Garcia e Birgel (1998) relataram que vacas sorologicamente reagentes ao VLEB e com altas contagens de leucócitos sanguíneos apresentavam um aumento na CCS no leite.

A hipótese que motivou este estudo se baseou nas possíveis variações funcionais de linfócitos e macrófagos do leite de animais infectados pelo VLEB e verificar o comprometimento dos mecanismos de defesa imunológicos da glândula mamária bovina, não só do envolvimento dos fagócitos, mas suas interações aos linfócitos comprometendo a imunidade efetiva contra infecções intramamárias (PARK et al., 1992, 1993; SORDILLO et al., 1991; TAYLOR et al., 1994; YAMAGUSHI et al., 1999).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A mamite representa um desafio ao setor lácteo por alterar quantitativamente e qualitativamente a produção de leite. É uma doença inflamatória associada principalmente aos processos infecciosos bacterianos (BANNERMAN et al., 2004). As interferências que processos virais causam direta ou indiretamente a essas mamas ainda são pouco investigadas. No entanto, as perdas econômicas ocasionadas pela doença intensifica a preocupação sobre a influência das enfermidades virais, como a LEB, na susceptibilidade da glândula mamária.

2.1 LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma enfermidade de bovinos que acomete principalmente os animais mantidos em regime intensivo e semi-intensivo (OTT; JOHNSON; WELLS, 2003; LOSINGER, 2006), onde a transmissão da doença pode ser favorecida. Coincidentemente nessa população encontra-se a maior susceptibilidade às afecções mamária. A LEB é uma enfermidade infecto-contagiosa, de caráter neoplásico causada por um vírus. Essa doença pode também apresentar discretas manifestações clínicas ou apresentar alterações hematológicas sob a forma de linfocitose persistente (GATEI et al., 1989; TAYLOR et al., 1992; ISAACSON et al., 1998; WU et al., 1999; SIMARD et al., 2000). O vírus da leucose dos bovinos (VLEB) é do gênero *Deltaretrovirus*, da subfamília *Ortoretrovirinae* da família *Retroviridae* (SCHWARTZ et al., 1994; WERLING et al., 1998).

Os bovinos são os únicos animais que se infectam naturalmente pelo VLEB, embora os ovinos sejam sensíveis a infecções experimentais (SCHWARTZ et al., 1994). A presença de anticorpos em humanos não é indicativa da infecção pelo VLEB, mas que estes tiveram contato com os antígenos virais, provavelmente pela alimentação (BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003).

Estudos anteriores referiram alterações hematológicas (FETROW; FERRER, 1982; DOMÉNECH et al., 2000; BEYER et al., 2002) e imunitárias (ALTREUTHER et al., 2001; AZEDO et al., 2007, 2008a, 2008b, SOUZA et al., 2008) dependentes do estágio ou da fase da

LEB em que os animais infectados se encontram. A possibilidade dessas alterarem também a eficiência dos mecanismos de defesa da glândula mamária ou mesmo na interpretação de algumas provas diagnósticas trivialmente empregadas deve ser considerada e investigada.

Nos diferentes estágios da LEB o animal pode ser positivo sorologicamente e não apresentar nenhuma alteração hematológica (60% dos animais). Aproximadamente 30% dos animais infectados podem apresentar alterações hematológicas manifestada pela linfocitose persistente. A fase mais grave da doença é a neoplásica, apesar de menos frequente (10% dos animais infectados), quando o vírus causa linfossarcomas (FETROW; FERRER, 1982; WERLING et al., 1998; BEYER et al., 2002; SANDEV et al., 2004). Apesar de serem consideradas fases da doença, as mesmas não são necessariamente subsequentes e os mecanismos de desenvolvimento das três formas distintas ainda não estão totalmente esclarecidos (DOMÉNECH et al., 2000).

No Brasil, o VLEB foi descrito pela primeira vez em 1943. Em seguida, foi relatada a presença desse vírus em diversos estados como: Acre, Rondônia, Amazonas, Pará, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (MATOS et al., 2005).

Por muito tempo, relatos baseados apenas na positividade dos animais não descreveram alterações funcionais consequentes a infecção (BRENNER et al. 1990; OTT; JOHNSON; WELLS, 2003; TIWARI et al., 2005; 2007). Estudos recentes que consideravam isoladamente o grupo com linfocitose persistente (AZEDO et al., 2007; BLAGITZ et al., 2008a; 2008b) descreveram interferências negativas ao sistema imune de animais infectados nesse estágio da doença.

Um dos motivos que pode explicar a cronicidade da doença é o fato do VLEB infectar as células da linhagem monócito-macrófagos e estas funcionarem como reservatório para o VLEB, semelhante à patogenia provocada por outras retrovíroses, como ocorre nas infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana e pelo vírus da imunodeficiência felina (WERLING et al., 1998; DOMÉNECH et al., 2000).

O VLEB afeta principalmente os linfócitos B (LETESSON et al., 1991; SCHWARTZ et al., 1994; STONE; HOF; DAVIS, 1995; WERLING et al., 1998; STONE et al., 2000) e seus mecanismos de proliferação (SCHWARTZ et al., 1994; MIRSKY et al., 1996; HOPKINS; DIGIACOMO, 1997; DOMÉNECH et al., 2000; ALTREUTHER et al., 2001; BUEHRING et al., 2003). A linfocitose de células B é resultante de uma porcentagem aumentada de linfócitos B CD5⁺ circulantes, associada a um menor, porém significativo,

aumento da população de células CD5- (DEPELCHIN et al., 1989; LETESSON et al., 1990; 1991).

Azedo et al. (2008b) verificaram, que os animais positivos para LEB e com linfocitose persistente apresentaram menor porcentagem de linfócitos sofrendo processo de apoptose e Souza et al. (2008) constataram que nestes mesmos animais a proliferação linfocitária *in vitro* foi deficiente tanto em grupos não estimulados quanto em grupos estimulados com Con-A (conavalina-A) e com LPS (lipopolissacarídeo). Fato que contribui para o estabelecimento da linfocitose persistente.

A infecção em outras populações celulares, como em linfócitos T (MIRSKY et al., 1996), monócitos (MIRSKY et al., 1996; WERLING et al., 1998; BLAGITZ et al. 2008) e em células granulocíticas (SCHWARTZ et al., 1994), foi investigada (SCHWARTZ et al., 1994; MIRSKY, et al., 1996). A partir da possibilidade do VLEB infectar outras populações celulares, estudos foram conduzidos para esclarecer a real patogenia nas células do sistema imunológico. Beyer et al. (2002), avaliaram a quantidade de linfócitos B e de linfócitos T no sangue de animais infectados pelo VLEB sem linfocitose persistente, com linfocitose persistente, e de animais negativos para LEB. Esses autores observaram que a quantidade de linfócitos B foi maior em animais positivos com linfocitose persistente e que a quantidade de linfócitos B foi menor em animais positivos e sem linfocitose persistente. Esse estudo identificou as subpopulações leucocitárias sanguíneas pela técnica de citometria de fluxo, descrita pela primeira vez em bovinos em 1986 (HAGELTORN; SAAD, 1986).

Durante a avaliação das células da linhagem monócito-macrófago, Doménech et al. (2000) observaram que estas poderiam ser infectadas pelo VLEB. Estes autores constataram que estas células apresentaram severas alterações na diferenciação, na vacuolização e lise celular, sendo a apoptose um fenômeno frequentemente observado. Os mesmos resultados foram observados por Altreuther et al. (2001). Para estes autores o VLEB pode infectar monócitos, mas não altera a funcionalidade e o fenótipo destas células. Apesar disso, estudos recentes realizados por Blagitz et al. (2008) identificaram reduções da atividade funcional das células da linhagem monócito-macrófagos de animais positivos para a LEB com linfocitose persistente.

A LEB pode ser diagnosticada por alterações hematológicas, sorodiagnóstico e por isolamento do agente. Atualmente as alterações hematológicas são consideradas inespecíficas (NAGY et al., 2002). O sorodiagnóstico é realizado por imunodifusão em ágar gel (IDGA) e pelo ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) (SIMARD et al., 2000; MATOS; BIRGEL JUNIOR; BIRGEL, 2005). O isolamento do

agente pode ser realizado pela cultura celular e pelo PCR, sendo este último responsável pela detecção direta do genoma viral (DE GIUSEPPE et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 1999; MOLLOY et al., 1990; NAIF et al., 1990; REICHERT; STEC, 1999). Em um estudo realizado por De Giuseppe et al. (2004) para comparação da eficiência no diagnóstico da LEB pela IDGA e pelo ELISA, foi constatado que o ELISA é o teste mais sensível e mais adequado no diagnóstico sorológico da LEB. Apesar disso, muitos autores recomendam a utilização rotineira dos dois testes laboratoriais, tanto da IDGA quanto do ELISA. As vantagens da IDGA estão relacionadas a praticidade e facilidade de execução do teste, associado ao baixo custo e alta especificidade (GONZÁLEZ, et al., 1999). Embora o ELISA apresente uma série de etapas, que exige treinamento, esse teste complementa o IDGA na maioria dos casos (GONZÁLEZ, et al., 1999).

A transmissão da LEB pode ocorrer pela via vertical ou horizontal (ROMERO; CRUZ; ROWE, 1983). O VLEB é principalmente transmitido pela via horizontal, através da exposição direta a fluidos biológicos contaminados com linfócitos infectados, principalmente os sanguíneos. A transmissão pode também ocorrer pela saliva, sêmen, colostro e leite (ROMERO; CRUZ; ROWE, 1983; MEAS et al., 2002), e possivelmente por micropartículas aerógenas, pois Roberts, Lucas e Wimberley (1982) isolaram o VLEB em lavados bronco-alveolares de bovinos infectados pelo VLEB.

Uma vez descrita a presença do vírus em células de diferentes origens, a importância que estas representariam para a transmissão da doença também foram consideradas, inclusive sua liberação no colostro e no leite. Meas et al. (2002) observaram que os bezerros de mães positivas não apresentaram o VLEB antes de receberem o colostro, porém os animais tornaram-se positivos após ingestão desse alimento. Desta forma, para estes autores a transmissão do vírus pela via transplacentária não ocorre e os neonatos adquirem o vírus pela ingestão do colostro. Estes resultados foram opostos aos encontrados por Thurmond et al. (1983) que observaram que a transmissão do VLEB, pode ocorrer durante a vida fetal.

Se o VLEB está presente no colostro e no leite, caracterizando-se como via de eliminação, potencialmente acarretaria alterações mamárias primárias, como acontece em outras doenças, como a CAE (Artrite Encefalite Caprina), responsável pela mamite endurativa. É interessante notar que a maioria dos estudos que relacionaram o VLEB com a glândula mamária foi realizada durante as décadas de 70 e 80 (LANGSTON et al., 1978; HUBER et al., 1981), atualmente, há disponibilidade de técnicas mais específicas, como a

citometria de fluxo que poderia associar avaliações funcionais e qualitativas que talvez elucidem a possível influência do VLEB na glândula mamária.

As perdas econômicas relacionadas com a LEB são a redução da produção de leite, redução do ganho de peso, condenação de carcaças e aumento dos gastos com animais de reposição e com veterinários. Por ser uma doença que causa grandes prejuízos econômicos, um recente estudo relacionou a LEB a outras enfermidades como a diarreia viral bovina, a paratuberculose e a neosporose (TIWARI et al., 2007). Embora alguns trabalhos relacionem a LEB à mamite (RUSOV; MILOJEVIC; STOJANOVIC, 1994; SANDEV et al., 2004) eles não esclarecem se o vírus interfere na função das células do sistema monócito-fagocítico.

Poucos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar a interferência viral na produção de leite. Motton e Buehring, (2003) referiram que o VLEB interfere nas funções das células epiteliais da glândula mamária e conseqüentemente na produção de leite. Nenhum outro estudo comprovou diretamente os efeitos do VLEB na resposta imune da glândula mamária do mesmo modo como foi observado por Azedo et al. (2008a) nas células sangüíneas. D'Angelino et al. (1998) mostraram que vacas sorologicamente positivas e com leucocitose apresentaram maior celularidade no leite, enquanto nos estudos realizados por Langston et al. (1978) não observaram essas alterações.

2.2 MAMITE

A inflamação da glândula mamária é caracterizada pelo recrutamento das células polimorfonucleares sangüneas para a glândula mamária, o que resulta em um significativo aumento da CCS (MEHRZAD et al., 2001). É uma enfermidade relacionada com grandes prejuízos econômicos na pecuária leiteira (RIVAS et al., 2002; 2006).

As bactérias causadoras da mamite podem ser classificadas em patógenos principais e secundários. São considerados os patógenos principais: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, coliformes, estreptococcus e enterococcus; e são considerados patógenos secundários: *Staphylococcus* spp coagulase negativo e os *Corynebacterium bovis* (SOUZA et al., 2009). *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são as espécies bacterianas mais prevalentes nos casos clínicos de mamite (BANNERMAN et al., 2004).

Em um estudo realizado por Souza et al. (2009) com 2.657 animais, as principais bactérias isoladas das amostras de leite foram: *Staphylococcus aureus*,

Streptococcus agalactiae, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp coagulase negativa e *Corynebacterium* spp. Nessa pesquisa, observaram que as glândulas mamárias infectadas com *Streptococcus agalactiae* apresentaram maior celularidade, com a média de 1.520.00 células/mL. Além disso, e 50% das amostras apresentaram contagens com valores iguais ou maior a 923.000 células/mL.

A proteção da glândula mamária ocorre por uma variedade de mecanismos de defesa, os quais são separados em duas categorias: imunidade inata e imunidade específica (LEITNER et al., 2000; SORDILLO; STREICHER, 2002; SLADEK; RYZNAROVA; RYSANEK, 2006). A imunidade inata, também conhecida como não específica, é a predominante durante o início da infecção (SORDILLO; STREICHER, 2002; SLADEK; RYZNAROVA; RYSANEK, 2010). Esta resposta é composta pela barreira física do orifício do teto, pelos macrófagos, neutrófilos, células *natural killer* (NK) e por alguns fatores solúveis (SORDILLO; STREICHER, 2002; SLADEK; RYSANEK, 1999; SLADEK, RYSANEK, 2010). Se essa imunidade for efetiva, muitos dos patógenos são rapidamente eliminados antes do sistema imune específico, mediado pelos linfócitos (SLADEK; RYSANEK, 1999; SORDILLO; STREICHER, 2002). Essa rápida eliminação do patógeno dificilmente acarreta alterações perceptíveis na qualidade e produção do leite (SORDILLO; STREICHER, 2002). No entanto, a eficiência da resposta da glândula mamária é dependente do tempo, da espécie bacteriana e da população celular residente (LEITNER et al., 2000; SORDILLO; STREICHER, 2002). A interação entre os patógenos invasores e o sistema imune é o fator determinante para o desencadeamento da infecção (SOLTYS; QUINN, 1999).

Se o patógeno não for eliminado pela imunidade inata, o sistema imune específico é acionado (SORDILLO; STREICHER, 2002; SLADEK; RYZNAROVA; RYSANEK, 2006). Caso o animal entre em contato com o mesmo antígeno mais de uma vez, uma reatividade poderá ocorrer como consequência da memória imunológica (SORDILLO; STREICHER, 2002).

O sistema imune específico é rápido e efetivo (SORDILLO; STREICHER, 2002). Uma forma do sistema imune conseguir distinguir e destruir os antígenos externos com alta diversidade genética, é através da expressão dos mesmos nas moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) presentes nas células apresentadoras de antígenos (SORDILLO; STREICHER, 2002). Na glândula mamária, é necessário que a imunidade inata e a adquirida interajam coordenadamente, a fim de fornecer uma proteção efetiva contra a mamite (SORDILLO; STREICHER, 2002).

Os tipos celulares predominantes no leite de glândulas mamárias sadias são os macrófagos (60%) e os linfócitos (28%). Em menor quantidade estão as células polimorfonucleares (5 a 12%). No leite de mamas infectadas, as células polimorfonucleares são predominantes (acima de 90%) (POLITIS et al., 1991; PARK et al., 1992; LEITNER et al., 2000; PILLAI et al., 2001; SLADEK; RYZNAROVA; RYSANEK, 2006; BAUMERT et al., 2009). Essas células desempenham um importante papel durante a inflamação (MONFARDINI et al., 2004) e são liberadas da medula óssea para a circulação sanguínea para atingir o foco da inflamação (MONFARDINI et al., 2004).

A glândula mamária dos bovinos é composta por três tipos celulares residentes: macrófagos, linfócitos e as células polimorfonucleares (SODILLO; STREICHER, 2002; SLADEK et al., 2010). Estas são as primeiras células que entram em contato com o patógeno e são responsáveis por atrair leucócitos para o foco inflamatório (LEITNER et al., 2000; PILLAI et al., 2001; RIVAS et al., 2001; RAINARD; RIOLLET, 2006; KOESS; HAMANN, 2008; BANNERMAN, 2004; BAUMERT, BRUCKMAIER; WELLNITZ, 2009; SLADEK; RYSANEK, 2010). Os macrófagos residentes são as células predominantes, as quais possuem duas características morfológicas diferentes. Podem ser caracterizados como monócitos (células não vacuolizadas, semelhantes aos monócitos do sangue) e como macrófagos (células com numerosos vacúolos). Estas células apresentam diferenças biológicas observadas na análise funcional dessas células (SLADEK; RYSANEK, 2010). Os macrófagos residentes sintetizam e liberam citocinas pró-inflamatórias que atraem a migração dos polimorfonucleares da circulação periférica para a glândula mamária (BANNERMAN, 2004). Esses atuam na primeira linha de defesa direcionada aos patógenos intra-mamários (PAAPE et al., 2000; CONEJEROS, 2011).

Os macrófagos da glândula mamária são responsáveis por fagocitar e destruir os patógenos invasores, pela remoção da gordura do leite de mamas em processo de involução, pela liberação de fatores quimiotáticos para as células polimorfonucleares e pela amplificação da resposta inflamatória (POLITIS et al., 1992).

O CD14 é um receptor celular, que está envolvido em uma série de respostas biológicas e imunológicas. Quando expresso nos leucócitos funciona como molécula chave no reconhecimento de patógenos invasores e no desencadeamento da cascata de reações inflamatórias (LEE et al., 2003). Este receptor é expresso pelas células polimorfonucleares (PAAPE et al., 1996; SLADEK; RYSANEK, 2006), mas principalmente pelos monócitos-macrófagos (PAAPE et al., 1996; RIOLETT et al., 2001; SLADEK; RYSANEK, 2006; KOESS; HAMANN, 2008; PIEPERS et al., 2009; SLADEK; RYSANEK, 2011).

O desmembramento do CD14 da membrana de monócitos e de neutrófilos resulta em CD14 solúvel nos fluidos corporais. Na presença de proteína de ligação LPS (*LPS-binding protein*), proteína sérica de fase aguda, há ligação do LPS formando o complexo LPS e proteína de ligação LPS. A formação desse complexo ameniza as manifestações clínicas na glândula mamária em caso de infecções causadas por bactérias gram-negativas.

Outra mediação importante dos monócitos/macrófagos é a liberação de citocinas, incluindo TNF- α , interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8 para iniciar a defesa imunológica (LEE et al., 2003). Pode-se observar que em glândulas mamárias infectadas com LPS, a reação inflamatória foi acompanhada com a expressão de CD14 na superfície de macrófagos e de neutrófilos (SLADEK; RYSANEK, 2006).

Em uma glândula mamária sadia, as células polimorfonucleares migram para a glândula mamária em baixas quantidades para manutenção da imunidade, no entanto, migram rapidamente para o foco inflamatório (PAAPE et al., 2002; 2003; MEHRZAD; DUCHATEAU; BURVENICH, 2009).

Por muito tempo, a função dos linfócitos na glândula mamária passou despercebida. Estudos recentes têm demonstrado que os linfócitos possuem importante atividade na glândula mamária (SOLTYIS; QUINN, 1999; VAN KAMPEN et al., 1999; HARP et al., 2004). Os linfócitos T desempenham um importante papel na resposta imune em virtude da sua capacidade de reconhecer antígenos com alto grau de especificidade, para agir como células efectoras e para regular a natureza e a intensidade da resposta imune (PARK et al., 1993; TAYLOR et al., 1997; ASAI et al., 1998; 2000; KIMURA et al. 1999; KEHRLI JUNIOR; HARP, 2001; LUN et al., 2007).

Os linfócitos T CD8⁺ estão presentes em maior quantidade do que os linfócitos T CD4⁺ no leite e glândula mamária de vacas (ASAI et al., 1998; YAMAGUCHI et al., 1999; RIOLLET; RAINARD; POUTREL, 2001). O acúmulo de linfócitos T CD8⁺ nas proximidades do epitélio sugere que estas células atuam na manutenção da integridade da glândula mamária, e na remoção das células infectadas ou danificadas (YAMAGUCHI et al., 1999; ASAI et al., 1998).

A importância dos linfócitos T na resposta imune da glândula mamária foi comprovada por Harp et al. (2006). Esses autores avaliaram a expressão das moléculas de adesão e migração dos linfócitos em infecções causadas por *Serratia marcescens* e *Streptococcus uberis*, verificaram que na infecção por *Serratia marcescens* a fenotipagem dos linfócitos era de células recém recrutadas da corrente sanguínea. Os autores atribuem este

fenômeno ao aparecimento de manifestações clínicas mais brandas nesta infecção, quando comparadas às provocadas por *Streptococcus uberis*.

Portanto, na presença de um processo infeccioso, a resposta imune inata é caracterizada por uma seqüência de eventos que inclui a ativação celular, adesão, migração para o local da inflamação e a remoção de patógenos invasores pelos fagócitos (PICCININI et al., 1999; RIVAS et al., 2002; SLADEK; RYSANEK, 2009). Uma vez que os patógenos são identificados, os macrófagos residentes liberam citocinas, ecosanóides, proteínas de fase aguda e substâncias quimiotáticas que provocam uma migração direta das células polimorfonucleares do sangue para o foco inflamatório (LEITNER et al., 2000; MONFARDINI et al., 2004; SLADEK et al., 2010; CONEJEROS et al., 2011; SLADEK; RYSANEK, 2011).

As células polimorfonucleares possuem receptores de superfície para as substâncias quimioatraentes, principalmente para a interleucina-8, que está envolvida no recrutamento destas células para a glândula mamária (ZHAO; LACASSE, 2008). Durante este processo, a liberação destas substâncias causam a marginação e aproximação de polimorfonucleares circulantes para a parede endotelial. Neste momento ocorre a expressão de moléculas de adesão e de migração, como a L-selectina, CD18, CD11b, CD44, que permitem a marginação e a migração destas células para o foco inflamatório (VAN OOSTVELDT et al., 2001; 2002; YAGI et al., 2002; MONFARDINI et al., 2004; RYSANEK et al., 2006; SOHN et al., 2007; SLADEK; RYSANEK, 2009). O aumento da expressão de CD11b e CD18 e a redução acentuada da expressão de L-selectina (CD62L+) têm sido observadas nas glândulas mamárias de vacas induzidas com LPS ou em vacas infectadas com bactérias Gram-positivas (VAN OOSTVELDT et al., 2001; 2002; YAGI et al., 2002; RYSANEK et al., 2006; SOHN et al., 2007).

Além dos polimorfonucleares, acarreta a migração de monócitos, que possuem características semelhantes às células precursoras, os monócitos sanguíneos (SLADEK; RYZNAROVA; RYSANEK, 2006). Os monócitos recém migrados para a glândula mamária se transformam em macrófagos inflamatórios e são responsáveis pela fagocitose da bactéria juntamente com as células polimorfonucleares (SLADEK et al., 2010).

Em seguida, as células do sistema imune inato apresentam receptores de reconhecimento de padrões (PPR – *pattern recognition receptors*) que reconhecem moléculas conservadas e expressasm nas superfícies dos patógenos, com baixa probabilidade de sofrerem mutações (PAMPs – *pathogen associated molecular pattern*). Exemplos de PRR são os receptores Toll (*Toll-like receptor*) presentes nas superfícies das células fagocíticas e

epiteliais, os quais são considerados moléculas essenciais na identificação dos patógenos invasores e na indução dos mecanismos de defesa mamária dos bovinos (WERLING et al., 2008; RYSANEK et al., 2006; SLADEK; RYSANEK, 2011). Tanto os macrófagos quanto os neutrófilos, ao reconhecerem os PAMPs, iniciam a fagocitose (CARNEIRO et al., 2009). Após a remoção dos patógenos via fagocitose, o processo inflamatório começa a ser finalizado. Então, as células polimorfonucleares sofrem apoptose e são fagocitadas pelos macrófagos na glândula mamária dos bovinos (DIEZ-FRAILE; MEYER; BURVENICH 2002; BAUMERT et al., 2009; SLADEK et al., 2010). Sabe-se que diante de um processo infeccioso e/ou inflamatório, a rápida diapedese das células polimorfonucleares para a glândula mamária atrasa a apoptose, aumenta a viabilidade celular (RIVAS et al., 2001; PRIN-MATHIEU et al. 2002; BOULET et al., 2004; MEHRZAD et al. 2004) e reduz a produção de peróxido de hidrogênio intracelular no foco inflamatório (SMITS et al., 1999).

A fase da lactação dos animais pode interferir na capacidade fagocítica das células polimorfonucleares. Durante o início da lactação, há um dano funcional das células polimorfonucleares que está diretamente relacionada com a maior susceptibilidade às infecções bacterianas neste período (MEHRZAD et al., 2001).

Durante a indução experimental de *Escherichia coli*, a capacidade dos polimorfonucleares para responderem ao estímulo quimiotático tem se mostrado relativamente negativa no início da doença. Na infecção aguda, observou-se queda na expressão de L-selectina pelos polimorfonucleares do sangue periférico acompanhada por leucopenia e aumento dos polimorfonucleares circulantes em formas imaturas (MONFARDINI et al., 2004; VANGROENWEGHE et al., 2004). Aproximadamente 48 horas após a infecção intra-mamária por *Escherichia coli*, os leucócitos circulantes apresentaram valores normais e a expressão da L-selectina pela superfície celular aumentou. Estes resultados sugerem que após o início da infecção aguda, o estímulo quimiotático induzido pela endotoxina bacteriana causou uma maior mobilização das células da medula óssea (MONFARDINI et al., 2004).

A apoptose é um tipo de morte celular altamente regulada e essencial na resolução de processos inflamatórios (THORNBERRY, 1998; VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000; SAVILL et al., 2002). É caracterizada por apresentar fragmentação do DNA, condensação da cromatina, encolhimento da célula e formação de corpos apoptóticos (THORNBERRY, 1998), além da externalização da fosfatidilserina. Assim, desequilíbrios nas taxas de apoptose podem levar a um predomínio das forças de proliferação e migração celulares, podendo levar à instalação de um processo inflamatório

crônico. Este dado é de extrema relevância no contexto da bovinocultura de leite, pois a mastite é a doença de maior custo da pecuária leiteira mundial (HILLERTON, 2005). Portanto, o papel chave da apoptose na resolução da inflamação se deve, entre outros fatores, ao fato de que nesse processo, não ocorre extravasamento citoplasmático e consequente estimulação inflamatória, ao contrário do que ocorre no processo de morte por necrose (SLADEK, RYSANEK, 2006).

A necrose é um processo que pode ser causado por dano físico ou biológico, e foi primeiramente diferenciado da apoptose através da análise de ultra-estrutura de células sofrendo cada um desses tipos de morte celular (KERR et al., 1972). A necrose é caracterizada por inchaço mitocondrial e perda imediata da integridade da membrana (DARZYNKIEWICZ et al., 1992), envolvendo extravasamento citoplasmático de moléculas pró-inflamatórias intracelulares e consequentes danos teciduais, enquanto a apoptose mantém a homeostase do tecido de forma segura e não-imunogênica (TIZARD, 2002; CHO et al., 2010). É importante frisar que apesar do termo “morte celular programada” ter sido comumente associado a apoptose, estudos recentes têm proposto que, sob condições específicas, a necrose representa um processo regulado e bem orquestrado (CHO et al., 2010). Frente a eliminação de patógenos invasores, as células realizam um processo denominado produção de peróxido de hidrogênio intracelular, que resulta na geração de espécies reativas de oxigênio que contribuem para a morte de possíveis patógenos (TIZARD, 2002), mas que podem lesionar o próprio tecido mamário. Dessa forma, não só a apoptose, mas também o subsequente *clearance* das células polimorfonucleares pelos fagócitos são processos cruciais na resolução da inflamação e a desregulação desses processos provavelmente contribui na patogênese da doença inflamatória crônica (FOX et al., 2010).

Além disso, a apoptose das células polimorfonucleares não só previne um aumento da reação inflamatória, mas também representa um estímulo anti-inflamatório para as outras células (FOX et al., 2010). Um exemplo é a fagocitose de células polimorfonucleares apoptóticas por macrófagos, que por meio da interação da fosfatidilserina exposta pelas células polimorfonucleares com um receptor no macrófago estimula a secreção de TGF- β e IL-10, que inibem a secreção de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α (HUYNH et al., 2002). Outro exemplo é a capacidade dos neutrófilos em apoptose de se ligar a LPS, impedindo a estimulação dos leucócitos por essa molécula sinal, e assim, impedindo uma intensificação da resposta inflamatória.

Por seu papel decisivo na manutenção, diminuição ou aumento do número de células envolvidas em um processo inflamatório, a apoptose tem grande influência sobre a CCS (contagem de células somáticas) do leite.

Como a presença das células polimorfonucleares na mama está correlacionada ao aumento da CCS observado na mamite (KELLY et al. 2000), a apoptose desse tipo celular também pode ser considerada um parâmetro de saúde da glândula mamária e um indicador da qualidade do leite.

Apesar de não trazer relatos na literatura de estudos sobre as possíveis alterações que o VLEB pode exercer na resposta imunológica da glândula mamária dos bovinos, vários mecanismos da resposta imune, já descritos em infecções bacterianas, podem estar comprometidos em animais com a LEB, como por exemplo a lactoferrina, a lactoperoxidase, a NAGase (RAINARD; RIOLLET 2006), avaliação das citocinas (SORDILLO; HICKS; PIGHETTI, 1994), das imunoglobulinas (KORHONEN et al., 2000) e das funções celulares pelo teste de fagocitose e do “burst” oxidativo (AZEDO et al., 2008a).

Estas são técnicas que vêm sendo utilizadas com o objetivo de testar a eficiência celular frente a um desafio imunológico. Azedo et al., 2008a, constataram que os animais soropositivos para a LEB e com linfocitose persistente apresentaram uma redução da função de células sanguíneas, mas não identificou o tipo celular. Kaczmarczyk et al. (2005), com o objetivo de avaliar a eficiência da fagocitose das células sanguíneas durante os primeiros meses após o parto de vacas naturalmente infectadas pelo VLEB, notaram que não houve diferença entre os animais com e sem LEB, classificando os animais somente como soropositivos ou negativos para a LEB.

O diagnóstico da mamite é baseada na contagem de células somáticas (CCS) (SOUZA et al., 2009) e no exame bacteriológico. Estes são testes recomendados pelo *International Dairy Federation* (IDF, 1984) para determinar a saúde da glândula mamária. A CCS determina a quantidade de células presentes no leite, incluindo os eosinófilos, os linfócitos, macrófagos, neutrófilos e as células epiteliais, porém esta não distingue esses tipos celulares, além de sofrer influência da lactação, do estágio da lactação e da estação do ano. É importante conhecer a proporção celular presente no leite, pois na mamite, os polimorfonucleares estão aumentados consideravelmente, geralmente acima de 90% (KOESS; HAMANN, 2008; SOUZA et al., 2009).

A contagem diferencial das células somáticas (CCS) é responsável por identificar e quantificar a proporção dos diferentes tipos celulares presentes no leite (RIVAS et al., 2001). Desta forma é possível detectar a mamite em fases iniciais, quando a CCS ainda

é baixa, porém com predomínio de polimorfonucleares. Baixa celularidade pode ocorrer tanto em mamas sadias quanto em mamas infectadas e a CCS diferencial é a técnica padrão para determinar a presença do processo inflamatório (RIVAS et al., 2001). Por ser um teste subjetivo, é considerado um teste de difícil repetibilidade. Ao contrário da citometria de fluxo, que tem a capacidade de mensurar uma grande quantidade de células em pequeno espaço de tempo (GERSTNER et al., 2006; KOESS; HAMANN, 2008), a CCS diferencial é uma técnica que consome muito tempo.

Alguns estudos vem utilizando a citometria de fluxo para a diferenciação das células do leite (ÖSTENSSON et al., 1988; PILLAI et al., 2001; RIVAS et al., 2001; DOSOGNE et al., 2003). Estes autores afirmam que a citometria de fluxo permite maior precisão na identificação celular, apesar de alguns resultados ainda serem contraditórios quanto ao posicionamento dos macrófagos (KOESS; HAMANN, 2008). Alguns padrões para a citometria do fluxo das células do leite não estão totalmente padronizados, mas mesmo assim, Koess e Hamann (2008) e Rivas et al. (2001) defendem esta técnica e afirmam que devido a sua simplicidade e praticidade permite o diagnóstico precoce da mamite. Para Rivas et al. (2001), a citometria de fluxo permite identificar e quantificar a viabilidade celular, que para os leucócitos lácteos costuma ser 20 a 30% menor do que os leucócitos sanguíneos. Para estes autores, a quantificação da viabilidade das células polimorfonucleares é essencial para o diagnóstico do estado inflamatório da glândula mamária.

A identificação por citometria de fluxo de células de leite bovino baseados apenas no tamanho e na granulosidade é controversa, pois a fagocitose de componentes do leite podem alterar tanto o tamanho quanto a granulosidade destas células. Além disso, os debris celulares podem interferir nas características normais das células. Estas dificuldades vêm sendo superadas com o emprego de novas metodologias aplicadas a citometria de fluxo para a contagem diferencial de leucócitos baseadas na utilização de anticorpos específicos (DOSOGNE et al., 2003).

A localização dos neutrófilos e dos linfócitos na citometria de fluxo é conhecida, porém a determinação da posição dos monócitos e dos macrófagos ainda não está clara (KOESS; HAMANN, 2008).

Portanto, pouco se conhece sobre as características funcionais das células presentes no leite de fêmeas bovinas, e suas variações na presença dos processos infecciosos da glândula mamária, que podem predispor ou determinar os quadros de mamite. Dentre os agentes infecciosos virais relacionados à imunidade sistêmica de bovinos, tem-se a LEB, que pode comprometer também a defesa imunológica da glândula mamária. Atualmente, com a

disponibilidade da citometria de fluxo essas indagações devem ser respondidas para o conhecimento e prejuízos econômicos que a LEB pode ocasionar direta ou indiretamente à produção e qualidade do leite.

3 OBJETIVO

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a atividade funcional dos fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos, em diferentes fases de infecção.

Dessa forma, os objetivos específicos foram avaliar as células do sangue e do leite dos animais infectados pelo VLEB quanto a:

- expressão de diferentes receptores de superfície celular de fagócitos e linfócitos;
- avaliar a morte celular dos fagócitos e do linfócito B;
- avaliar o potencial de fagocitose e produção intracelular de peróxido de hidrogênio pelas células CD14⁺ e CH138⁺.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para execução do projeto, as avaliações da resposta imunitária mamária foram precedidas por uma etapa de triagem dos animais e composição dos grupos conforme descrito a seguir.

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi dividido em duas fases. Na primeira fase, a de triagem das vacas, 194 vacas da raça holandesa, mantidas em sistema de produção conforme as exigências para a produção de leite do tipo B, localizadas nos municípios de Tambaú – SP e Santa Rita do Passa Quatro – SP, foram avaliadas quanto à presença da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica dos Bovinos e classificadas, segundo resultados de hemogramas seriados, de acordo com Kettmann et al. (1987), em:

- a) Vacas negativas no sorodiagnóstico da leucose enzoótica dos bovinos (grupo N);
- b) Vacas positivas e sem linfocitose persistente (Grupo AL);
- c) Vacas positivas e com linfocitose persistente (Grupo LP).

Foi considerado como critério de inclusão amostral a ausência de antecedentes de tratamento para mamite por no mínimo 30 dias, ausência de teto afuncional e estabilidade do perfil hematológico.

Na segunda fase, as mamas de dez animais pertencentes a cada grupo foram avaliadas, subsequentemente, as amostras de leite foram colhidas e submetidas às avaliações citológicas e bacteriológicas, além das amostras de sangue e de leite obtidas para a avaliação funcional das células da linhagem fagocítica. O projeto desenvolvido foi aprovado pela Comissão de Bioética, em 13 de julho de 2009, protocolado sob o nº 1685/2009.

4.2 PRIMEIRA FASE

Caracterizou-se por primeira fase do estudo, a etapa de colheita de amostras de sangue para a análise hematológica e para a realização do sorodiagnóstico para a Leucose Enzoótica Bovina.

4.2.1 Colheita de sangue

Foram colhidas, de cada animal, duas amostras de sangue, utilizando sistema a vácuo¹, por venopunção caudal, uma em tubo siliconizado, sem anticoagulante, com capacidade de 10 mL, para a obtenção do soro, e outra em tubo siliconizado com EDTA² dipotássico, com capacidade de 4 ml, para a realização de hemograma.

Após aproximadamente 110 dias da primeira coleta, novas amostras de sangue foram coletadas para a verificação da normalidade no hemograma e identificação das vacas dos grupos negativo e AL e das vacas do grupo LP, segundo critérios estabelecidos para espécie (Quadro 1).

Unidade	Leucócitos totais	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Monócitos	Basófilos
(10 ³ /μL)	5,6 – 12,7	1,1 - 5,7	2,3 – 9,3	0 – 2,0	0 – 0,6	0 – 0,2
%	-	15 - 47	45 – 75	0 - 20	2 – 7	0 - 2

(Fonte: KRAMER et al, 2000; DIVERS; PEEK, 2008)

Quadro 1 – Valores do leucograma de bovinos saudáveis, em número absoluto e contagem diferencial relativa utilizada como referência no presente estudo – São Paulo – 2011.

¹ Sistema Vacutainer® - Becton Dickinson™, San Diego, CA.

² Ethylenediamine tetraacetic acid - ácido etilenodiamino tetra-acético

4.2.2 Análise hematológica

O número total de leucócitos por microlitro foi mensurado por meio de contagem automática (ABC Vet® - ABX™). A contagem diferencial foi feita por esfregaços sanguíneos corados pela técnica de Rosenfeld (1947) para a diferenciação do padrão leucocitário ao microscópio óptico.

4.2.3 Sorodiagnóstico

Para a detecção dos anticorpos séricos específicos anti-VLEB, foi empregada a técnica da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony³ (Imunodifusão em Ágar gel – IDGA) e Kits comerciais⁴ de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando o antígeno glicoprotéico (gp 51) extraído do envelope do VLEB.

Foi considerada uma vaca positiva para a LEB, aquela diagnosticada como sororreagente no teste de IDGA (de maior especificidade), e negativa, aquela apresentando diagnóstico negativo no teste ELISA (de maior sensibilidade).

4.3 SEGUNDA FASE

Para a segunda fase do experimento, foram selecionadas nove vacas do grupo negativo, dez vacas do grupo AL e seis vacas do grupo LP. Nesta fase foram colhidas amostras de sangue e de leite para a avaliação funcional e para a quantificação das populações leucocitárias, além das amostras para as avaliações citológicas e bacteriológicas dos 25 animais selecionados.

³ Kit comercial contendo antígeno para diagnóstico de Leucose Enzoótica Bovina – Produção: Laboratório TECPAR, Curitiba, PR, com controle de qualidade da MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento).

⁴ *Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit*® - VRMD, Inc., Pulman, WA, USA, n° cat. 284-5.

4.3.1 Colheita de leite

Após a realização do exame físico da glândula mamária acrescido da realização do exame do fundo escuro e do *California mastitis test* (CMT), as amostras de leite foram colhidas em três alíquotas. A primeira foi destinada à avaliação e a quantificação das populações leucocitárias, a segunda para a contagem de células somáticas (CCS) automática e a terceira para o exame bacteriológico. Após a colheita das amostras de leite, as vacas foram ordenhadas e em seguida as amostras de sangue foram colhidas.

4.3.1.1 Exame clínico da glândula mamária

A avaliação clínica das vacas lactantes foi feita por meio do exame físico da glândula mamária e do exame do leite (BIRGEL, 2004). Todos os quartos mamários foram avaliados por inspeção e palpação, examinando-se o parênquima, tetos e estruturas internas (*ductus papilaris*, *sinus lactifer* e *papillaris*). As características das glândulas foram registradas, destacando-se as possíveis alterações encontradas.

4.3.1.2 Teste do fundo escuro

Imediatamente antes da colheita das amostras, foi realizada a higienização do úbere por meio da imersão de cada teto em solução anti-séptica e a secagem com papel toalha individual. Em seguida foi realizada a prova do fundo escuro (DIRKSEN; GRUNDER; STOBER, 1993), observando-se cor, consistência e presença de massas ou grumos.

4.3.1.3 CMT

Após o teste do fundo escuro foi realizado o CMT, utilizando detergente comercial específico⁵ para realização do Teste CMT (2 mL do reagente em 2 mL de leite), observando-se a intensidade da reação (aumento da viscosidade da mistura leite – reagente) e variações do pH (SCHALM; NOORLANDER, 1957).

4.3.1.4 Contagem de células somáticas automática

As amostras de leite encaminhadas para a CCS automática foram colhidas em frascos, com capacidade de 50 ml, contendo como conservante o bronopol. O material foi acondicionado em caixas e enviado para análise no Laboratório de Fisiologia da Lactação do Departamento de Fisiologia do Centro de Tecnologia para o Gerenciamento da Pecuária de Leite da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), Piracicaba – SP.

4.3.1.5 Exame bacteriológico

Para o exame bacteriológico foi realizada a anti-sepsia do teto de acordo com o *National Mastitis Council* (HARMON et al., 1990). As amostras de leite foram acondicionadas, em frascos estéreis específicos, sob refrigeração até a chegada no laboratório.

As amostras de leite foram analisadas no Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

No laboratório, as amostras de leite foram congeladas para posteriormente serem semeadas em placas de *Petri* contendo meio de ágar-sangue de carneiro (ágar base⁶

⁵ Reativo específico, marca: Fatec®.

⁶ Blood Agar base – Oxoid Hampshire - U.K.

acrescido de 7 % de sangue de carneiro) e ágar *Sabourand-dextrose*⁷ e incubadas (37° C por 24 e 72 horas) (BAUER, 1966). Para as amostras de leite com crescimento bacteriano foi feita a identificação das bactérias por meio de provas bioquímicas (LENNETTE et al., 1985), seguida da classificação estabelecida por Krieg e Holt (1994) e Murray et al. (1999).

Para realização de correlação, o exame bacteriológico foi classificado por escore, dependendo do agente encontrado na amostra analisada, sendo amostra negativa (zero), amostra positiva com *Corynebacterium bovis* (um), *Staphylococcus chromogenes* (dois) e *Streptococcus dysgalactiae* (três).

4.3.1.6 Avaliação da celularidade

A celularidade foi avaliada por técnicas indireta e direta. A técnica indireta foi realizada no momento da colheita conforme descrito anteriormente no item 3.3.1.3. Para a técnica direta foi empregada a técnica padrão em laboratório integrante da Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite – RBQL e credenciado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Desta forma, as amostras de leite foram transferidas para frascos contendo como conservante o bronopole encaminhadas para a Clínica do Leite – ESALQ - USP, Piracicaba – SP.

4.3.2 Colheita de sangue

Foram colhidas de cada vaca, três amostras de sangue, uma em tubo sem anticoagulante, para a confirmação do sorodiagnóstico da LEB, outra em tubo com EDTA dipotássico para a realização de hemograma e outra em tubo com heparina para a avaliação funcional e para a quantificação das populações leucocitárias.

4.3.3 Avaliação imunitária

⁷ Sabourand dextrose Agar - Oxoid Hampshire - U.K.

Foram realizadas avaliações das atividades funcionais e quantificações das populações leucocitárias nas amostras de sangue e de leite.

4.3.3.1 Isolamento da suspensão celular das amostras de leite

Foram colhidos aproximadamente 1.000 mL de leite por amostra em frascos com capacidade para 500 mL. Em cada frasco, foram colocados 500 mL de PBS⁸ e 500 mL de leite. Estas foram mantidas e encaminhadas ao laboratório sob refrigeração.

No laboratório, as amostras foram transferidas para três frascos de centrifugação com capacidade para 1.000 mL, até totalizar 800 mL de amostra de leite (Leite + PBS). As amostras foram centrifugadas⁹ a 1.000 g por 15 minutos (4°C), conforme as orientações de Koesse Hamann (2008). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado pela inversão única do frasco. O botão celular, conservado na superfície inferior do frasco, foi removido por meio de aspersão gentil de aproximadamente 30 mL de PBS e transferido para quatro frascos de 50 mL. O mesmo procedimento repetiu-se nos três frascos de cada amostra. Uma segunda aspersão de 10 mL de PBS foi realizada. Em seguida, estas amostras foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos (4°C). Após desprezado o sobrenadante, o botão celular formado foi ressuspendido em aproximadamente 10 mL de PBS. As amostras de cada quarto mamário foram unidas em um único frasco de 50 mL. Este foi novamente centrifugado a 400 g por 10 minutos a 4°C. Após desprezar o sobrenadante, as células foram ressuspensas em um mL de meio de cultivo celular (RPMI 1640)¹⁰ enriquecido com Soro Fetal Bovino (SFB) 10% (KOESS; HAMANN, 2008).

⁸ *Phosphate buffered saline* – tampão fosfato-salino.

⁹ Equipamento da Marca Sorwall®, com capacidade de 6.000 mL de amostra

¹⁰ *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640) – Sigma R7638.

4.3.3.2 Viabilidade e concentração celular das amostras de leite

Após a formação do botão celular, a contagem celular foi realizada na câmara de *Newbauer* e a viabilidade celular foi avaliada por meio da exclusão do azul de *Trypan*. Em seguida, a suspensão celular foi ajustada em 2×10^6 células viáveis/mL para a realização das provas imunológicas.

4.3.3.3 Quantificações das populações de leucócitos das amostras de sangue e de leite

As amostras sanguíneas e lácteas foram avaliadas por citometria de fluxo¹¹ quanto às porcentagens de células. Para a identificação e diferenciação dos linfócitos T foram utilizados anticorpos monoclonais primários: *mouse IgG1 anti-bovine CD3*¹², *mouse IgG2a anti-bovine CD4*¹³ e *mouse IgM anti-bovine CD8*¹⁴. Os anticorpos monoclonais secundários foram: *goat anti-mouse IgG1* conjugado ao fluorocromo ficoeritrina-Cy5 (PE-Cy5)¹⁵, *goat anti-mouse IgG2a* conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE)¹⁶ e *goat anti-mouse IgM* conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC)¹⁷. Para a identificação e diferenciação de linfócitos B foram utilizados anticorpos monoclonais: *mouse IgM anti-bovine CD21*¹⁸, *mouse IgG2a anti-bovine CD5*¹⁹ e *mouse IgG1 anti-bovine CD11b*²⁰. Os anticorpos monoclonais secundários foram: *goat anti-mouse IgG1* conjugado ao fluorocromo ficoeritrina-Cy5 (PE-Cy5)¹⁵, *goat anti-mouse IgG2a* conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE)¹⁶, *goat anti-mouse IgM* conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC)¹⁷. Para a identificação dos monócitos e dos macrófagos foi utilizado o anticorpo monoclonal *mouse IgG1 anti-bovine*

¹¹ FACSCalibur™ - Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, EUA.

¹² VMRD, Pullman, EUA, nº cat. MM1A

¹³ VMRD, Pullman, EUA, nº cat. ILA11

¹⁴ VMRD, Pullman, EUA, nº cat. BAQ111A

¹⁵ Invitrogen, Carlsbad, EUA, nº cat. M32018

¹⁶ Invitrogen, Carlsbad, EUA, nº cat. M32404

¹⁷ Invitrogen, Carlsbad, EUA, nº cat. M32501

¹⁸ VMRD, Pullman, EUA, nº cat. BAQ15A

¹⁹ VMRD, Pullman, EUA, nº cat. B29A

²⁰ VMRD, Pullman, EUA, nº cat. MM12A

CD14²¹ e o anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse* IgG1 conjugado ao fluorocromo ficoeritrina-Cy5 (PE-Cy5)¹⁵. Para a identificação das células polimorfonucleares (CH138+) do sangue dos leucócitos (CH138+) do leite foi utilizado o anticorpo monoclonal *mouse* IgM anti-bovine CH138A²² e o anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse* IgM conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE)²³, expostos no quadro 2.

Calibração	Ensaio “A”	Só células (sangue ou suspensão celular de leite)
	Ensaio “B”	Células + CD21-IgM + IgM-FITC
	Ensaio “C”	Células + CD4-IgG2a + IgG2a-PE
	Ensaio “D”	Células + CD11b-IgG1 + IgG1-PE-Cy5
Experimento	Ensaio “E”: Linfócitos T	CD3-IgG1 + IgG1-PE-Cy5 CD4-IgG2a + IgG2a-PE CD8-IgM + IgM-FITC
	Ensaio “F”: Linfócitos B	CD5-IgG2a + IgG2a-PE CD21-IgM + IgM-FITC CD11b-IgG1 + IgG1-PE-Cy5
	Ensaio “H”: Macrófagos	CD14-IgG1 + IgG1-PE-Cy5
	Ensaio “T”: Neutrófilos	CH138-IgM + IgM-PE

Quadro 2 – Protocolo dos tubos utilizados para a calibração e tubos utilizados para o experimento, segundo conteúdo (células sanguíneas ou células da suspensão celular do leite, anticorpos monoclonais primários e secundários) para realização das quantificações das populações de leucócitos das amostras de sangue e leite no Citômetro de fluxo (FACSCaliburTM - *Becton Dickinson Immunocytometry System*TM) - São Paulo - 2011

Nos tubos para a análise das amostras de sangue foram adicionados 100 µL de sangue periférico e nos tubos para a análise das amostras de leite foram adicionados 100 µL da suspensão celular. Para as amostras de sangue, procedeu-se a lise hipotônica e a centrifugação²⁴ a 250g por 8 minutos. Após a repetição do procedimento, as amostras de sangue e de leite foram ressuspendidas em 1.000 µL de PBS⁸ e novamente centrifugadas. Após o botão ter sido ressuspendido novamente em 100 µL de PBS⁸, foi adicionado um µL do respectivo anticorpo primário e procedeu-se à incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período,

²¹ VMRD, Pullman, EUA, n° cat. MM61A

²² VMRD, Pullman, EUA, n° cat. CH138A

²³ Invitrogen, Carlsbad, EUA, n° cat. M31504

²⁴ Eppendorf *Centrifuge* 5810R

foram adicionados 1.000 µL de PBS⁸ e realizada nova centrifugação. Seguida de ressuspensão em 100 µL de PBS⁸ com um µL do respectivo anticorpo secundário. Incubou-se por 30 minutos à temperatura ambiente sob ausência de luz, para então adicionar 1.000 µL de PBS em cada tubo e submetê-los a centrifugação em 250 g por 8 minutos. Ao final, foram adicionados 300 µL de PBS + BSA (0,1%)²⁵ e as amostras foram adquiridas.

Os procedimentos para as amostras de leite foram semelhantes a partir da etapa da lise hipotônica realizada nas amostras de sangue.

Para as amostras de sangue foram adquiridos aproximadamente trinta mil eventos de cada amostra e para as amostras de leite foram adquiridos aproximadamente dez mil eventos utilizando-se do programa CELLQUEST^{®26}.

4.3.3.4 Liberação de peróxido de hidrogênio e de fagocitose

Os ensaios para a avaliação da produção intracelular de peróxido de hidrogênio e de fagocitose por leucócitos sanguíneos e lácteos foram realizados por citometria de fluxo²⁷, conforme técnicas empregadas por Hasui et al. (1989), que utilizaram amostras de sangue humano e por Smits, Burvenich e Heyneman (1997) e Kampem, Tollersrud e Lund (2004a, 2004b) que avaliaram amostras de sangue bovino e modificadas de acordo com Azedo (2007).

Para a realização do ensaio da fagocitose, foi necessária a conjugação de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (O98:H28) a iodeto de propídio²⁸. Este procedimento foi realizado conforme estabelecido por Hasui, Hirabayashi e Kobayashi (1989) com algumas modificações conforme descrito por Souza (2010).

Nas amostras de sangue foram adicionados 100 µL de sangue periférico de cada animal e foi incubado²⁹ a 37°C por 30 minutos com 0,3 µM de 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA)³⁰ para avaliar a produção intracelular de peróxido de hidrogênio e com

²⁵ BSA - Albumina Bovina Fração V. Cod.: 1870. Lote: 830.874. Marca: Inlab.

²⁶ Becton Dickinson Immunocytometry Systems[™].

²⁷ FACSCalibur[™] - Becton Dickinson Immunocytometry System[™], San Diego, EUA.

²⁸ Sigma Aldrich, St. Louis, n° cat. P4170

²⁹ Banho-Maria – Modelo 102, Marca Fanen Ltda[®] - São Paulo – SP.

³⁰ Sigma Aldrich, St. Louis, n° cat. D6883

Staphylococcus aureus (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (O98:H28) conjugadas a iodeto de propídio. Nas amostras de leite, os produtos acima descritos foram incubados com 100 µL da suspensão celular. Após o período de incubação, tanto nas amostras de sangue quanto de leite, foi adicionado em todos os tubos 2.000 µL de solução gelada de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (3 mM) e centrifugado a 250 g por 8 minutos. Em seguida, nas amostras de sangue procedeu-se a lise hipotônica e a centrifugação. Após desprezar o sobrenadante, 100 µL de PBS⁸ foi adicionado e os respectivos anticorpos também. Para a identificação dos monócitos do sangue e dos macrófagos do leite foi utilizado o anticorpo monoclonal *mouse* IgG1 *anti-bovine* CD14²¹ e o anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse* IgG1 conjugado ao fluorocromo *Allophycocyanin* (APC)³¹. Para a identificação das células polimorfonucleares (CH138+) do sangue e dos leucócitos (CH138+) do leite foi utilizado o anticorpo monoclonal *mouse* IgM *anti-bovine* CH138A²² e o anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse* IgM conjugado ao fluorocromo *Allophycocyanin* (APC)³², expostos no quadro 3.

Calibração	Ensaio “A”	só células (Posteriormente + PI)
	Ensaio “B”	Células + DCFH-FITC
	Ensaio “C”	Células + SaPI-PI
	Ensaio “D”	Células + DCFH-FITC + CD14-IgG1 + IgG1-APC + PI
Experimento	Ensaio “E”:	Células + DCFH-FITC + CH138-IgM + IgM-APC + PI
	Ensaio “F”:	Células + SaPI-PI + CD14-IgG1 + IgG1-APC + CH138-IgM + IgM-FITC
	Ensaio “G”:	Células + E.coli-PI + CD14-IgG1 + IgG1-APC + CH138-IgM + IgM-FITC

Quadro 3 – Protocolo dos tubos de calibração e tubos de experimento, segundo conteúdo (células sanguíneas ou células da suspensão celular do leite, anticorpos monoclonais primários e secundários) para realização da quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio e de fagocitose das amostras de sangue e leite no Citômetro de fluxo (FACSCaliburTM - Becton Dickinson Immunocytometry SystemTM) – São Paulo – 2011.

Inicialmente foi adicionado um µL do respectivo anticorpo primário e seguido de incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados

³¹ Invitrogen, Carlsbad, EUA, n° cat. A10541

³² Invitrogen, Carlsbad, EUA, n° cat. M31505

1.000 μL de PBS⁸ e novamente centrifugados. Em seguida foram ressuspensos em 100 μL de PBS⁸ e adicionou-se um μL do respectivo anticorpo secundário. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, sob a ausência da luminosidade, foram adicionados 1.000 μL de PBS em cada tubo e centrifugados a 250 g por 8 minutos. Ao final, foram ressuspensos em 300 μL de PBS⁸ e as amostras foram adquiridas pelo Citômetro de fluxo²⁶.

Para as amostras de sangue foram adquiridos aproximadamente trinta mil eventos de cada amostra e para as amostras de leite adquiriu-se aproximadamente dez mil eventos utilizando-se do programa CELLQUEST^{®33}. A produção de peróxido de hidrogênio intracelular foi mensurada pela porcentagem de células produzindo peróxido de hidrogênio intracelular e pela intensidade média de fluorescência do DCFH em valores arbitrários dos leucócitos.

4.3.3.5 Avaliação da morte celular

Nos ensaios para a avaliação de morte celular por apoptose empregou-se a Anexina V-FITC³⁴. Para avaliar as células que estavam em processo de morte celular por necrose, utilizou-se o iodeto de propídio. Estes procedimentos foram conduzidos segundo as técnicas empregadas por Debacq et al. (2002).

Nas amostras de sangue foram adicionados 100 μL de sangue periférico. Em seguida, foi realizada lise hipotônica seguida da centrifugação a 250 g por 8 minutos. Após este procedimento, sendo repetido, nas amostras de sangue e de leite foram adicionados 1.000 μL de tampão de ligação³⁵ em todos os tubos. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação e ressuspensas em solução de tampão de ligação com Anexina V-FITC. Em seguida, as amostras foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luminosidade. Nos tubos foram adicionados 1.000 μL de tampão de ligação e centrifugados. Após desprezar o sobrenadante, 100 μL de PBS⁸ foram adicionados juntamente com os respectivos anticorpos. Para a identificação dos monócitos do sangue e dos macrófagos do leite

³³ Becton Dickinson Immunocytometry Systems™.

³⁴ APOPTTEST™-FITC, Dako Cytomation, Finlândia, nº cat. K2350

³⁵ 10 mM HEPES/150 mM NaCl/ 1 mM MgCl₂/ 1,8 mM CaCl₂

foi utilizado o anticorpo monoclonal *mouse* IgG1 *anti-bovine* CD14²¹ e o anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse* IgG1 conjugado ao fluorocromo *Allophycocyanin* (APC)³². Para a identificação das células polimorfonucleares (CH138+) do sangue e dos leucócitos (CH138+) do leite foi utilizado o anticorpo monoclonal *mouse* IgM *anti-bovine* CH138A²² e o anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse* IgM conjugado ao fluorocromo *Allophycocyanin* (APC)³², expostos no quadro 4.

Calibração	Ensaio “A”	só células
	Ensaio “B”	Células + ANEXINA-FITC
	Ensaio “C”	Células + PI
Experimento	Ensaio “E”:	Células + ANEXINA-FITC + PI + CD14-IgG1 + IgG1-APC
	Ensaio “F”:	Células + ANEXINA-FITC + PI + CH138-IgM + IgM-APC
	Ensaio “G”:	Células + ANEXINA-FITC + PI + CD21-IgM + IgM-APC

Quadro 4 – Protocolo dos tubos de calibração e tubos de experimento, segundo conteúdo (células sanguíneas ou células da suspensão celular do leite, anticorpos monoclonais primários e secundários) para realização da avaliação da morte celular no Citômetro de fluxo (FACSCaliburTM - Becton Dickinson Immunocytometry SystemTM) – São Paulo – 2011

Adicionou-se um μL do respectivo anticorpo primário e incubou-se por 30 minutos em temperatura ambiente e adicionaram-se 1.000 μL de PBS⁸ e procedeu-se nova centrifugação. Em seguida foram ressuspensos em 100 μL de PBS⁸ e foi adicionado um μL do respectivo anticorpo secundário. Foi incubado por 30 minutos em temperatura ambiente sob a ausência da luminosidade, para adicionar 1.000 μL de PBS⁸ em cada tubo e centrifugar a 250 g por 8 minutos. Ao final, foram acrescentados 300 μL de PBS⁸ e as amostras foram adquiridas.

Para as amostras de sangue foram adquiridos aproximadamente trinta mil eventos de cada amostra e para as amostras de leite foram adquiridos aproximadamente dez mil eventos utilizando-se do programa CELLQUEST^{®33}.

4.4 ANÁLISE DA CITOMETRIA DE FLUXO

Os dados obtidos nas leituras da Citometria de fluxo foram analisados em *software* próprio (*Flow Jo*³⁶)

Inicialmente, nas amostras de sangue, os dados foram analisados pelo tamanho e granulosidade pelo gráfico (SSC x FSC). Foram identificadas duas populações celulares: as populações constituídas por células mononucleares e as populações constituídas por células polimorfonucleares. Em seguida, foram identificadas as populações celulares de acordo com a expressão de anticorpos. Para as análises da atividade funcional, após as populações estarem identificadas quanto à expressão dos anticorpos, a atividade funcional foi analisada dentro da população especificada.

Nas amostras de leite, devido à presença de grande quantidade de debris celulares, os leucócitos foram localizados pelo tamanho e granulosidade (SSC x FSC). Em seguida, para a localização da população de macrófagos, novamente o gráfico foi analisado pelo tamanho e granulosidade, conforme descrito por Rysanek et al (2006) e Sladek et al (2010). Após ter sido identificada e selecionada a população de macrófagos, foram identificados os macrófagos que estariam expressando o CD14+. Já para a localização dos leucócitos CH138+ e dos linfócitos T e B, não foi necessária a localização prévia dos mesmos.

Para as avaliações da produção de peróxido de hidrogênio intracelular e da apoptose celular, os mesmos procedimentos foram realizados.

Para a avaliação da fagocitose, não foram necessárias a identificação dos macrófagos, tendo sido feita por exclusão de células que não expressaram o anticorpo CH138.

³⁶ *Treestar* – Versão 7.6.1 para Windows.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* estatístico MINITAB[®], versão 15³⁷.

Foi verificada a normalidade da distribuição dos resultados, utilizando-se teste de Anderson-Darling. Para a avaliação das diferenças entre as médias dos resultados obtidos, foram realizados os testes de análise de variância *ANOVA One-way (Unstacked)* (para dados com distribuição normal) e *Mann-Whitney* (para dados que não apresentaram distribuição normal). Para todos os resultados, foram consideradas significantes as análises que apresentaram $p \leq 0,05$.

³⁷ GlobalTech Informática[™], Belo Horizonte, MG

5 RESULTADOS

Os resultados das análises das amostras tanto das células do sangue quanto do leite estão apresentados em duas etapas. Na primeira etapa estão expostos os resultados descritivos das análises das amostras de sangue e de leite de toda população submetida aos critérios de inclusão amostral para composição dos grupos experimentais. Na segunda etapa estão apresentados os resultados das avaliações funcionais das células do sangue e subsequente associação aos resultados das avaliações funcionais das células do leite, tendo como referência os fagócitos das vacas naturalmente infectadas pelo VLEB.

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA

Conforme proposto no delineamento, para composição dos grupos experimentais, as vacas foram submetidas a duas triagens.

5.1.1 Triagens

Foram colhidas amostras de sangue de 194 vacas da raça Holandesa preto e branco pertencentes a rebanhos comerciais de produção de leite tipo B, do Estado de São Paulo, em condições semelhantes de manejo sanitário. Na primeira fazenda, localizada na cidade de Tambaú, foram colhidas amostras de sangue de 149 vacas e na segunda fazenda, localizada na cidade de Santa Rita do Passa Quatro, foram colhidas amostras de sangue de 45 vacas.

Das 194 vacas, 98 (50,50%) foram positivas e dez (5,20%) foram negativas para a pesquisa de anticorpos anti-gp51 do VLEB nos testes ELISA e IDGA. As 86 (44,30%) vacas restantes não atenderam ao critério de inclusão amostral, onde se apresentaram negativas na IDGA e positivas no ELISA e desta forma foram excluídas dessa investigação.

Com o objetivo de identificar as vacas positivas ao VLEB que apresentaram linfocitose persistente e de confirmar a soronegatividade e a normalidade do hemograma das

demais vacas, após 110 dias da colheita inicial das amostras de sangue foi realizada uma segunda triagem. Foram consideradas vacas com linfocitose persistente, aquelas com contagem total de linfócitos superior a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ e a contagem de leucócitos superior a $15 \times 10^3/\mu\text{L}$ conforme critérios estabelecidos por Brenner et al. (2007).

Das 98 vacas positivas, 72 pertenciam a primeira fazenda e 26 vacas a segunda fazenda. Das dez vacas negativas, nove pertenciam a primeira fazenda e uma a segunda fazenda.

Os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e dos linfócitos das amostras negativas e positivas para a LEB obtidas na primeira e na segunda triagem estão expressos na tabela 1.

5.1.2 Experimento

Atendidos os critérios de inclusão amostral, 25 vacas foram selecionadas e alocadas nos respectivos grupos, a saber: nove vacas negativas na pesquisa de anticorpos para o VLEB (grupo negativo); dez vacas positivas e sem linfocitose (grupo AL) e seis vacas positivas e manifestando linfocitose persistente (grupo LP).

Os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e do mínimo e máximo dos valores absolutos e relativos dos leucócitos e dos linfócitos das amostras de sangue das vacas utilizados no experimento, estão descritos na tabela 2.

Tabela 1 – Valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e dos linfócitos das amostras positivas e negativas para LEB obtidas na primeira e segunda triagem – São Paulo – 2011

				Grupos		
				Negativo	Positivo	
Triagem 1	Valores absolutos	Média		11,38	14,71	
		Leucócitos desvio padrão (x10 ³)/μL		(±2,49)	(±7,40)	
		Mediana		11,85	13,00	
		(Mínimo - Máximo)		(6,90-15,40)	(4,10- 49,30)	
		Média		7,00	10,01	
		Linfócitos desvio padrão (x10 ³)/μL		(±2,24)	(±6,64)	
	Valores relativos	Mediana		6,78	8,52	
		(Mínimo - Máximo)		(4,65-12,16)	(2,05-41,41)	
		Média		59,20	61,76	
		Linfócitos desvio padrão (%)		(±13,24)	(±13,65)	
		Mediana		61,00	63,50	
		(Mínimo - Máximo)		(38,00-75,00)	(24,00-85,00)	
	Linfócitos atípicos (%)	Média		2,60	3,22	
		desvio padrão		(±1,89)	(±2,19)	
		Mediana		2,50	3,00	
		(Mínimo - Máximo)		(0,00-5,00)	(0,00-10,00)	
Total de amostras de sangue			10	98		
			N	AL	LP	
Triagem 2	Valores absolutos	Média		9,14	9,27	22,48
		Leucócitos desvio padrão (x10 ³)/μL		(±2,12)	(±2,02)	(±3,75)
		Mediana		9,00	9,65	21,10
		(Mínimo - Máximo)		(5,40-13,10)	(4,30-12,10)	(17,40-29,00)
		Média		5,72	5,67	16,82
		Linfócitos desvio padrão (x10 ³)/μL		(±1,43)	(±1,90)	(±4,05)
	Valores relativos	Mediana		5,31	5,68	16,28
		(Mínimo - Máximo)		(3,51-8,64)	(1,93-10,28)	(10,71-24,94)
		Média		60,11	57,25	61,98
		Linfócitos desvio padrão (%)		(±10,06)	(±11,69)	(±26,93)
		Mediana		61,00	56,50	76,00
		(Mínimo - Máximo)		(44,00-76,00)	(39,00-83,00)	(0,78-79,00)
	Linfócitos atípicos (%)	Média		3,00	3,14	4,67
		desvio padrão		(±2,12)	(±2,01)	(±3,00)
		Mediana		3,00	3,00	6,00
		(Mínimo -Máximo)		(0,00-7,00)	(0,00-7,00)	(0,00-8,00)
Total de amostras de sangue			09	28	09	

N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Tabela 2 – Valores das médias, dos desvios-padrões, das medianas e dos valores mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e dos linfócitos das amostras de sangue das vacas utilizadas no experimento – São Paulo – 2011

			Grupos		
			N	AL	LP
Experimento	Valores absolutos	Média	8,95	9,27	24,10
		Leucócitos (x10 ³)/μL			
		Desvio padrão	(±2,11)	(±2,60)	(±3,73)
		Mediana	9,60	8,45	23,50
		(Mínimo - Máximo)	(6,30-11,70)	(5,70-14,70)	(20,00-30,40)
		Média	5,14	5,64	18,10
	Valores relativos	Linfócitos (x10 ³)/μL			
		Desvio padrão	(±1,09)	(±1,86)	(±3,19)
		Mediana	4,64	5,42	18,90
		(Mínimo - Máximo)	(3,75-7,36)	(3,00-8,52)	(14,11-22,19)
		Média	53,22	52,20	61,67
		Linfócitos (%)			
		Desvio padrão	(±10,53)	(±11,06)	(±12,50)
		Mediana	54,00	54,50	60,50
		(Mínimo - Máximo)	(40,00-66,00)	(29,00-64,00)	(46,00-78,00)
Linfócitos atípicos (%)	Média	5,44	8,50	13,33	
	Desvio padrão	(±4,98)	(±4,53)	(±9,67)	
	Mediana	4,00	8,00	14,50	
	(Mínimo - Máximo)	(2,00-18,00)	(2,00-15,00)	(0,00-26,00)	
Total de amostras de sangue			09	10	06

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

5.1.3 Amostras de leite

Das 25 vacas selecionadas para o experimento, sete (28,00%) estavam na fase inicial da lactação (período de até 90 dias do início da lactação), três (12,00%) vacas estavam na metade da fase de lactação (período entre 91 e 180 dias do início da lactação) e 15 (60,00%) vacas estavam na fase final da lactação (período entre 181 e 270 dias do início da lactação). Das sete vacas que estavam na fase inicial da lactação, cinco (71,42%) pertenciam ao grupo negativo e duas (28,58%) ao grupo LP. Das três vacas que estavam na metade da fase de lactação, duas (66,67%) delas pertenciam ao grupo negativo e uma (33,33%) vaca ao grupo AL. E das 15 vacas que estavam na fase final da lactação, duas (13,33%) pertenciam ao grupo negativo, nove (60,00%) ao grupo AL e quatro (26,67%) ao grupo LP.

No exame do fundo escuro, das 100 amostras examinadas proveniente das 25 vacas selecionadas, 96 (96,00%) foram negativas e quatro (4,00%) foram positivas. Das 96 amostras negativas, 36 (37,50%) eram provenientes de mamas de vacas do grupo negativo, 38 (39,60%) de vacas do grupo AL e 22 (22,90%) de vacas do grupo LP. Das quatro amostras positivas, duas (50,00%) foram provenientes de mamas de vacas do grupo AL e duas (50,00%) de mamas de vacas do grupo LP.

No exame do CMT, foi observado que 71 (71,00%) amostras foram negativas e 29 (29,00%) foram positivas. Das 71 amostras negativas, 29 (40,80%) foram provenientes de vacas do grupo negativo, 25 (35,20%) de vacas do grupo AL e 17 (24,00%) de vacas do grupo LP. Das 29 amostras positivas, 13 (44,80%) apresentaram traços, oito (27,60%) “+”, sete (24,00%) “++” e uma (3,40%) apresentou “+++”. Das 13 amostras que apresentaram traços, uma (7,70%) foi proveniente de vaca do grupo negativo, 11 (84,60%) de vacas do grupo AL e uma (7,70%) de vaca do grupo LP. Entre as amostras com escore “+”, três amostras pertenciam ao grupo negativo, três ao grupo AL e duas ao grupo LP. Das sete amostras com “++”, três (42,80%) foram provenientes de mamas de vacas do grupo negativo e quatro (57,20%) de vacas do grupo AL. A única amostra “+++” foi de mama de vaca do grupo AL. Não foram observadas diferenças entre os grupos ($p>0,05$).

Na CCS automática das 100 amostras enviadas para a análise, 95 foram analisadas. Nesta análise, foi observado que as vacas do grupo AL apresentaram maior celularidade do que as vacas do grupo negativo e do que as vacas do grupo LP ($p<0,05$). Não foram observadas diferenças entre as vacas do grupo negativo e as vacas do grupo LP ($p>0,05$).

No exame bacteriológico, das 100 amostras de leite analisadas, 76 (76,00%) foram negativas e 24 (24,00%) foram positivas. Das 76 negativas, 27 (35,50%) foram de mamas de vacas do grupo negativo, 25 (32,90%) de vacas do grupo AL e 24 (31,60%) de vacas do grupo LP. Das 24 amostras positivas, em 16 (66,70%) foi isolado o *Corynebacterium bovis*, em sete (29,00%) o *Streptococcus dysgalactiae* e em uma (4,20%) foi isolado o *Staphylococcus chromogenes*. Das 16 amostras que foi isolado o *Corynebacterium bovis*, sete (43,70%) foram de mamas de vacas do grupo negativo e nove (56,30%) de vacas do grupo AL. Das sete amostras que foi isolado o *Streptococcus dysgalactiae*, apenas uma (14,30%) foi de mama de vacas do grupo negativo e seis (85,70%) de vacas do grupo AL. A única amostra que foi isolada o *Staphylococcus chromogenes* foi proveniente de mama de vaca do grupo negativo. Não foram observadas diferenças entre os grupos ($p>0,05$).

Os valores das porcentagens do exame do fundo escuro, do exame do CMT, do exame bacteriológico e os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e os valores mínimo e o máximo da CCS em relação aos grupo experimentais estão expressos na tabela 3.

Tabela 3 – Valores percentuais do Exame do Fundo Escuro, Exame do CMT, do Exame bacteriológico e os valores das Médias, dos desvios padrão, das medianas, e dos valores mínimo e máximo da CCS automática em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2011

		Grupos			Total de amostras de leite
		N	AL	LP	
Exame do fundo escuro	N	36 (37,5%)	38 (39,6%)	22 (22,9%)	96
	A	0	0	0	0
	B	0	02 (100%)	0	02
	C	0	0	0	0
	D	0	0	0	0
	E	0	01 (100%)	0	01
	F	0	01 (100%)	0	01
Exame do CMT	Negativo	29 (40,8%)	25 (35,2%)	17 (24%)	71
	“traços”	01 (7,7%)	11 (84,6%)	01 (7,7%)	13
	“+”	03 (37,5%)	03 (37,5%)	02 (25%)	08
	“++”	03 (42,8%)	0	04 (57,2%)	07
	“+++”	0	01 (100%)	0	01
Exame bacteriológico	Negativo	27 (35,5%)	25 (32,9%)	24 (31,6%)	76
	<i>Corynebacterium bovis</i>	07 (29,0%)	09 (56,3%)	0	
	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	01 (14,3%)	06 (85,7%)	0	24
	<i>Straphylococcus chromogenes</i>	01 (100%)	0	0	
CCS* automático (CCS/ml)	Média	403.278	708.949	143.200	
	Desvio-padrão	(±1.382.914)	(±1.094.679)	(±316.751)	
	Mediana	40.000 ^a	214.000 ^b	18.000 ^a	
	(Mínimo e máximo)	(2.000 - 7.094.000)	(1.000- 4.991.000)	(1.000 -1.260.000)	

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Exame do fundo Escuro: (DIRKSEN et al, 1993)

N: Leite normal

A: conservadas as características do leite, consistência aquosa, sem grumo

B: conservadas as características do leite, mas é aquoso, com presença de pequenos grumos.

C: conservadas as características do leite, mas com grumos grandes.

D: conservadas as características do leite, mas com muitos grumos grandes

E: perda gradual das características do leite, consiste principalmente em grumos

F: perda total das características do leite

*CCS : contagem de células somáticas

5.2 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS FAGÓCITOS DO SANGUE E DO LEITE

Após a quantificação das populações de leucócitos nas amostras de sangue e a descrição das análises das amostras de leite, a avaliação funcional procedeu-se por meio das análises da fagocitose, da liberação de peróxido de hidrogênio intracelular e morte das células presentes nas amostras de sangue e de leite.

5.2.1 Populações de células mononucleares CD14+ do sangue e de macrófagos CD14+ do leite

Nas tabelas 4 e 5 estão representados os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células mononucleares CD14+ das amostras de sangue e de leite, respectivamente.

Tabela 4 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativos das células mononucleares CD14+ das amostras de sangue – São Paulo – 2011

			Grupos		
			N	AL	LP
Sangue	Mononucleares	Média	51,52 ^a	52,43 ^a	73,58 ^b
		Desvio padrão	(±5,00)	(±5,82)	(±6,09)
		Mediana	50,20	50,75	74,75
		(Mínimo - máximo)	(45,80-61,70)	(43,30-60,50)	(62,70-79,40)
	Leucócitos	Média	6,15 ^a	4,30 ^a	5,50 ^a
		Desvio padrão	(±1,91)	(±1,63)	(±1,78)
		Mediana	5,59	3,69	5,07
		(Mínimo - máximo)	(3,24-9,88)	(2,81-7,97)	(3,31 – 8,40)
	CD14+	Média	11,99	8,19	7,70
		Desvio padrão	(±3,62)	(±3,03)	(±3,25)
		Mediana	10,60 ^a	7,26 ^b	6,61 ^b
		(Mínimo - máximo)	(6,63-17,80)	(5,43-15,80)	(4,22-13,40)
Total de amostras de sangue			09	10	06

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CD14+/Leucócitos: valores da expressão de CD14 em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CD14+/Mononucleares: expressão de CD14 em relação a população de células mononucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulocidade (FSC x SSC)

Tabela 5 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células mononucleares CD14+ das amostras de leite – São Paulo – 2011

		Grupos			
		N	AL	LP	
Leite	Leucócitos	Média	86,58	88,75	86,76
		Desvio padrão	(±9,07)	(±6,69)	(±8,82)
		Mediana	87,45 ^a	89,60 ^a	86,40 ^a
		(Mínimo - máximo)	(60,00-99,30)	(75,50-98,20)	(74,10-98,90)
	Células totais	Média	28,14	45,12	41,24
		Desvio padrão	(±12,95)	(±12,17)	(±13,67)
		Mediana	24,80 ^a	44,60 ^b	42,30 ^b
		(Mínimo - máximo)	(4,50-53,00)	(25,40-73,30)	(18,20-66,40)
	Macrófagos	Média	32,54	50,93	47,02
		Desvio padrão	(±14,90)	(±13,34)	(±13,57)
		Mediana	29,00 ^a	50,85 ^b	50,70 ^b
		(Mínimo - máximo)	(5,11-67,80)	(28,00-79,70)	(24,60-71,50)
	Leucócitos	Média	16,68 ^a	26,02 ^b	22,59 ^b
		Desvio padrão	(±8,81)	(±12,09)	(±8,48)
		Mediana	15,05	24,00	22,30
		(Mínimo - máximo)	(1,92-47,80)	(4,12-54,40)	(8,99-36,60)
CD14+	Leucócitos	Média	53,20	51,59	48,30
		Desvio padrão	(±17,54)	(±21,66)	(±10,76)
		Mediana	54,25 ^a	48,25 ^a	49,35 ^a
		(Mínimo - máximo)	(19,00-82,90)	(14,30-88,90)	(28,80-71,40)
	Macrófagos	Média	53,20	51,59	48,30
		Desvio padrão	(±17,54)	(±21,66)	(±10,76)
		Mediana	54,25 ^a	48,25 ^a	49,35 ^a
		(Mínimo - máximo)	(19,00-82,90)	(14,30-88,90)	(28,80-71,40)
Total de amostras de leite		36	40	24	

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Macrófagos/Células totais: valores de macrófagos em relação as células totais do leite

Macrófagos/Leucócitos: valores de macrófagos em relação a população de leucócitos lácteos

CD14+/Leucócitos: valores da expressão de CD14 em relação as células totais do leite

CD14+/Macrófagos: valores da expressão de CD14 em relação a população de leucócitos lácteos

Nas amostras de sangue, as vacas do grupo LP apresentaram maiores quantidades de células mononucleares do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$), diferenças que não foram encontradas entre as vacas dos grupos negativos e AL ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças entre as quantidades de leucócitos CD14+ ($p > 0,05$), mas foram encontradas diferenças na quantidade de células mononucleares CD14+, onde as vacas dos grupos AL e LP apresentaram menores quantidades do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$). Estas diferenças não foram encontradas entre as vacas dos grupos AL e LP ($p > 0,05$).

A figura 1 representa exemplos da identificação de células mononucleares (CD14+) do sangue de vacas dos grupos negativo, AL e LP.

Figura 1 – Exemplos de identificação de células mononucleares e de células mononucleares CD14+ nos leucócitos do sangue de vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite não foram detectadas diferenças na quantidade de leucócitos em relação ao grupo ($p>0,05$). Em relação as células totais e leucócitos, as vacas dos grupos AL e LP apresentaram maior quantidade de macrófagos do que as vacas do grupo negativo ($p<0,05$), diferenças que não foram encontradas entre as vacas dos grupos AL e LP ($p>0,05$). As vacas dos grupos AL e LP apresentaram maior quantidade de leucócitos CD14+ do que as vacas do grupo negativo ($p<0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas dos grupos AL e LP ($p>0,05$). Não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à quantidade de macrófagos CD14+ ($p>0,05$).

A figura 2 demonstra exemplos da identificação de macrófagos CD14+ do leite de vacas dos grupos negativo, AL e LP.

Figura 2 – Exemplos de identificação da população de leucócitos, de macrófagos e de macrófagos CD14+ nas amostras de leite de vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.2.2 Populações de células polimorfonucleares CH138+ do sangue e de leucócitos (CH138+) do leite

Na tabela 6 estão representados os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ do leite.

Tabela 6 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativos das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ do leite em relação aos grupos experimentais – São Paulo – 2011

			N	Grupos	
				AL	LP
Células do sangue	Polimorfonucleares	Média	35,76 ^a	35,74 ^a	16,52 ^b
		Desvio padrão	(±7,15)	(±6,65)	(±6,28)
		Mediana	37,80	37,50	14,00
		(Mínimo - máximo)	(24,80-45,10)	(24,10-43,60)	(11,00-27,60)
	Leucócitos	Média	33,27 ^a	32,48 ^a	14,87 ^b
		Desvio padrão	(±6,53)	(±5,90)	(±7,06)
		Mediana	34,30	33,95	13,65
		(Mínimo - máximo)	(24,10-44,20)	(21,80-42,40)	(7,19-26,90)
	CH138+	Média	93,22	91,69	87,60
		Desvio padrão	(±4,64)	(±10,92)	(±13,54)
		Mediana	92,90 ^a	97,05 ^a	94,20 ^a
		(Mínimo - máximo)	(85,10-98,10)	(65,90-99,50)	(65,50-98,00)
Total de amostras de sangue			09	10	06
			N	Grupos	
				AL	LP
Células do leite	Leucócitos	Média	87,41	81,24	86,88
		Desvio padrão	(±7,59)	(±6,64)	(±6,08)
		Mediana	89,05 ^a	80,10 ^b	85,95 ^a
		(Mínimo - máximo)	(63,80-98,50)	(69,70-96,70)	(78,20-99,20)
	Células totais	Média	22,01	19,87	15,50
		Desvio padrão	(±19,82)	(±15,48)	(±17,82)
		Mediana	15,20 ^a	17,40 ^a	8,94 ^a
		(Mínimo - máximo)	(0,92-70,00)	(1,86-52,10)	(0,99-60,40)
	CH138+	Média	24,56	24,76	17,19
		Desvio padrão	(±21,67)	(±19,38)	(±18,89)
		Mediana	17,00 ^a	21,40 ^a	10,80 ^a
		(Mínimo - máximo)	(0,93-79,90)	(2,11-66,40)	(1,15-64,50)
Total de amostras de leite			36	40	24

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CH138+/Leucócitos: valores da expressão de CD138 em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CH138+/Polimorfonucleares: expressão de CH138 em relação a população de células polimorfonucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulosidade (FSC x SSC)

CH138+/Células totais: valores da expressão de CH138 em relação as células totais do leite

CH138+/Leucócitos: valores da expressão de CH138 em relação a população de leucócitos lácteos

No gráfico 1 estão representadas as medianas das células mononucleares CD14+ e das células polimorfonucleares CH138+ das amostras de sangue e no gráfico 2 estão representadas as medianas dos macrófagos e dos leucócitos CD14+ e CH138+ do leite.

Gráfico 1 – Valores das medianas das células mononucleares CD14+ e dos polimorfonucleares CH138+ do sangue – São Paulo – 2011

Gráfico 2 – Valores das medianas dos macrófagos e dos macrófagos (CD14+) e dos leucócitos CH138+ do leite – São Paulo – 2011

Nas amostras de sangue, as vacas do grupo LP apresentaram menores quantidades de células polimorfonucleares e de leucócitos CH138+ do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$). Em ambos os casos, não foram encontradas diferenças entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$). Também não foram encontradas diferenças na quantidade de células polimorfonucleares CH138+ entre os grupos ($p > 0,05$).

A figura 3 ilustra exemplos da identificação de células polimorfonucleares CH138+ do sangue de vacas dos grupos negativo, AL e LP.

Figura 3 – Exemplos de identificação de células polimorfonucleares e células polimorfonucleares CH138+ no sangue de vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite, as vacas AL apresentaram menor quantidade de leucócitos do que as vacas do grupo negativo e do grupo LP ($p < 0,05$). Já as vacas do grupo LP apresentaram-se semelhantes ao grupo das vacas do grupo negativo ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças nas quantidades de células totais CH138+ e de leucócitos CH138+ entre os grupos ($p > 0,05$).

A figura 4 representa exemplos da identificação de leucócitos CH138+ do leite de vacas dos grupos negativo, AL e LP.

Figura 4 – Exemplos de identificação da população de leucócitos e de leucócitos CH138+ no leite de vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.2.3 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular das amostras do sangue e do leite

Inicialmente estão apresentados os resultados da produção de peróxido de hidrogênio intracelular das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ do leite. Posteriormente estão apresentados os resultados das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ do leite.

5.2.3.1 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular das células mononucleares (CD14+) do sangue e dos macrófagos (CD14+) do leite

Nas tabelas 7 e 8 estão representados os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ do leite que produziram peróxido de hidrogênio intracelular, respectivamente.

Tabela 7 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células mononucleares CD14+ do sangue que produziram peróxido de hidrogênio intracelular nos diferentes grupos experimentais – São Paulo – 2011

			N	Grupos AL	LP
Sangue	Mononucleares	Média	39,88 ^a	47,63 ^a	59,68 ^b
		Desvio padrão	(±11,07)	(±10,00)	(±9,80)
		Mediana	41,40	47,80	59,00
		(Mínimo - máximo)	(25,30-60,90)	(24,60-63,00)	(48,40-74,00)
		Média	3,63 ^a	3,46 ^a	3,40 ^a
	Leucócitos	Desvio padrão	(±0,72)	(±2,08)	(±1,51)
		Mediana	3,50	2,39	2,95
		(Mínimo - máximo)	(2,88-5,31)	(1,38-6,97)	(1,66-5,84)
		Média	9,84 ^a	7,45 ^a	6,04 ^a
	Mononucleares	Desvio padrão	(±3,33)	(±4,55)	(±3,27)
		Mediana	8,66	5,87	5,30
		(Mínimo - máximo)	(4,73-14,80)	(2,66-16,30)	(2,25-11,30)
		Média	59,09 ^a	61,36 ^a	44,00 ^a
	Peróxido de hidrogênio	Desvio padrão	(±18,79)	(±18,67)	(±14,72)
		Mediana	57,40	63,50	42,60
		(Mínimo - máximo)	(31,70-82,50)	(31,30-83,30)	(24,30-65,80)
		Média	25,06	11,56	271
	Intensidade de Fluorescência	Desvio padrão	(±26,80)	(±7,89)	(±322)
		Mediana	18,40 ^a	10,25 ^a	117 ^b
		(Mínimo - máximo)	(2,61-77,20)	(2,16-25,20)	(16-847)
Total de amostras de sangue		09	10	06	

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CD14+/Leucócitos: valores da expressão de CD14 em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CD14+/Mononucleares: expressão de CD14 em relação a população de células mononucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulocidade (FSC x SSC)

Tabela 8 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo dos macrófagos CD14+ do leite que produziram peróxido de hidrogênio intracelular nos diferentes grupos experimentais – São Paulo – 2011

Experimentais			São Paulo - 2014		
			N	Grupos AL	LP
Leite	Leucócitos	Média	89,72	87,19	84,00
		Desvio padrão	(±7,85)	(±7,13)	(±8,73)
		Mediana	92,15 ^a	88,75 ^b	81,80 ^b
		(Mínimo - máximo)	(67,10-98,70)	(68,40-95,90)	(70,20-99,60)
	Células totais	Média	37,99 ^a	39,92 ^a	38,23 ^a
		Desvio padrão	(±13,52)	(±11,20)	(±11,86)
		Mediana	35,75	40,00	39,40
		(Mínimo - máximo)	(14,40-69,60)	(15,10-60,00)	(17,00-64,10)
	Macrófagos	Média	42,07 ^a	45,73 ^a	44,93 ^a
		Desvio padrão	(±13,85)	(±11,71)	(±11,20)
		Mediana	38,75	45,25	46,35
		(Mínimo - máximo)	(15,70-71,80)	(15,70-67,40)	(24,20-68,20)
	Leucócitos	Média	12,43	12,11	17,22
		Desvio padrão	(±9,02)	(±7,67)	(±8,31)
		Mediana	10,35 ^a	11,05 ^b	15,80 ^b
		(Mínimo - máximo)	(0,44-32,40)	(0,93-41,20)	(5,09-33,60)
	Macrófagos	Média	27,94	26,44	41,75
		Desvio padrão	(±16,14)	(±14,18)	(±23,62)
		Mediana	25,00 ^a	25,00 ^a	34,95 ^b
		(Mínimo - máximo)	(1,17-67,50)	(4,78-70,80)	(12,30-77,60)
	Produção de hidróxido de hidrogênio	Média	20,35	21,96	29,03
		Desvio padrão	(±11,96)	(±17,64)	(±18,45)
		Mediana	18,80 ^a	15,70 ^a	28,25 ^a
		(Mínimo - máximo)	(4,53-59,00)	(5,24-76,10)	(5,42-70,60)
	Intensidade de Fluorescência	Média	48,70	35,30	91,40
		Desvio padrão	(±185,60)	(±72,90)	(±233,50)
		Mediana	13,30 ^a	14,40 ^a	14,70 ^a
		(Mínimo - máximo)	(4,7-1129,00)	(2,0-425,00)	(6,5-1139,00)
Total de amostras de leite			36	40	24

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Macrófagos/Células totais: valores de macrófagos em relação as células totais do leite

Macrófagos/Leucócitos: valores de macrófagos em relação a população de leucócitos lácteos

CD14+/Leucócitos: valores da expressão de CD14 em relação as células totais do leite

CD14+/Macrófagos: valores da expressão de CD14 em relação a população de leucócitos lácteos

Nas amostras de sangue, as vacas do grupo LP apresentaram maiores quantidades de células mononucleares do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$), diferenças que não foram encontradas entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$). Não foram detectadas diferenças na quantidade de leucócitos CD14+ e de células mononucleares CD14+ entre os grupos ($p > 0,05$). Estas diferenças também não foram observadas na quantidade de células mononucleares CD14+ que produziram peróxido de hidrogênio intracelular entre os grupos ($p > 0,05$). Quanto a intensidade de fluorescência, observou-se que as células mononucleares CD14+ das vacas do grupo LP apresentaram maior fluorescência do que as vacas dos grupos negativos e AL ($p < 0,05$).

A figura 5 ilustra exemplos da identificação de células mononucleares CD14⁺ do sangue de vacas dos grupos negativo, AL e LP que produziram peróxido de hidrogênio intracelular.

Figura 5 – Exemplos de identificação de células mononucleares CD14⁺ do sangue de vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) que produziram peróxido de hidrogênio intracelular – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite, as vacas dos grupos AL e LP apresentaram menor quantidade de leucócitos do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$), enquanto que a quantidade de leucócitos nas vacas dos grupos AL e LP foram semelhantes ($p > 0,05$). Não foram notadas diferenças entre os grupos quanto às quantidades de macrófagos em relação às células totais e em relação aos leucócitos ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de leucócitos CD14⁺ e de macrófagos CD14⁺ do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$). Também não foram constatadas diferenças quanto a produção de peróxido de hidrogênio intracelular e quanto a intensidade de fluorescência entre as vacas dos diferentes grupos ($p > 0,05$).

A figura 6 representa exemplos da identificação de macrófagos CD14⁺ do leite de vacas dos grupos negativo, AL e LP que produziram peróxido de hidrogênio intracelular.

Figura 6 – Exemplos de identificação de macrófagos CD14+ do leite de vaca que produziram peróxido de hidrogênio intracelular, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.2.3.2 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ do leite

Na tabela 9 estão representados os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ do leite que produziram peróxido de hidrogênio intracelular.

Tabela 9 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ das amostras de leite que produziram peróxido de hidrogênio intracelular entre os diferentes grupos experimentais – São Paulo – 2011

			N	Grupos AL	LP
Sangue	Polimorfonucleares	Média	35,14 ^a	33,72 ^a	27,12 ^a
		Desvio padrão	(±6,50)	(±6,37)	(±11,48)
		Mediana	37,30	34,10	23,95
		(Mínimo - máximo)	(23,10-43,70)	(23,30-44,10)	(13,50-42,90)
	Leucócitos	Média	32,88 ^a	27,79 ^a	22,45 ^a
		Desvio padrão	(±6,45)	(±8,26)	(±11,87)
		Mediana	34,70	31,05	22,15
		(Mínimo - máximo)	(22,20-40,60)	(15,00-36,80)	(4,71-37,00)
	Polimorfonucleares	Média	93,48	83,09	78,75
		Desvio padrão	(±4,02)	(±21,09)	(23,26)
		Mediana	95,90 ^a	93,10 ^a	83,65 ^a
		(Mínimo - máximo)	(85,60-97,30)	(41,90-97,70)	(35,00-97,40)
	Peróxido de hidrogênio	Média	89,27	93,86	63,53
		Desvio padrão	(±14,24)	(±4,07)	(±13,48)
		Mediana	92,80 ^a	94,95 ^a	70,95 ^b
		(Mínimo - máximo)	(53,60-99,80)	(85,70-98,00)	(45,30-73,40)
	Intensidade de fluorescência	Média	468,00	299,10	433,50
		Desvio padrão	(±317,00)	(±187,40)	(±238,70)
		Mediana	232 ^a	239,5 ^a	372,0 ^a
		(Mínimo - máximo)	(154-849)	(175,0-810,0)	(116,0-730,0)
Total de amostras de sangue			09	10	06
			N	Grupos AL	LP
Leite	Leucócitos	Média	89,19	88,63	84,42
		Desvio padrão	(±8,57)	(±6,13)	(±9,79)
		Mediana	91,90 ^a	91,15 ^a	80,55 ^a
		(Mínimo - máximo)	(63,40-98,50)	(74,40-95,70)	(71,20-99,50)
	Células totais	Média	22,71	17,80	17,98
		Desvio padrão	(±20,05)	(±13,48)	(±20,45)
		Mediana	16,55 ^a	16,15 ^a	7,41 ^a
		(Mínimo - máximo)	(0,70-76,00)	(0,64-48,10)	(0,67-67,20)
	Leucócitos	Média	24,42	19,95	19,45
		Desvio padrão	(±20,81)	(±14,68)	(±20,67)
		Mediana	18,95 ^a	19,40 ^a	9,93 ^a
		(Mínimo - máximo)	(0,74-77,10)	(0,69-50,40)	(0,86-67,70)
	Produção de hidróxido de hidrogênio	Média	50,50	58,98	62,47
		Desvio padrão	(±25,20)	(±26,69)	(±16,11)
		Mediana	47,85 ^a	63,50 ^{ab}	68,55 ^b
		(Mínimo - máximo)	(4,98-88,80)	(3,71-93,60)	(33,10-81,60)
	Intensidade de fluorescência	Média	658,00	838,00	528,70
		Desvio padrão	(±779)	(±709)	(±357,4)
		Mediana	126,00 ^a	976,00 ^a	576,50 ^a
		(Mínimo - máximo)	(10-2560,00)	(3-2256,00)	(17,2-1377,00)
Total de amostras de leite			36	40	24

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CH138+/Leucócitos: valores da expressão de CH138 em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CH138+/Polimorfonucleares: expressão de CH138 em relação a população de células polimorfonucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulosidade (FSC x SSC)

CH138+/Células totais: valores da expressão de CH138 em relação as células totais do leite

CH138+/Leucócitos: valores da expressão de CH138 em relação a população de leucócitos lácteos

No gráfico 3 estão representadas as médias das células mononucleares CD14+ e das células polimorfonucleares CH138+ das amostras de sangue que produziram

peróxido de hidrogênio intracelular e no gráfico 4 estão representadas as medianas dos macrófagos CD14+ e dos leucócitos CH138+ do leite que produziram peróxido de hidrogênio intracelular.

Gráfico 3 – Valores médios das células mononucleares que expressaram CD14 e das células polimorfonucleares CH138+ do sangue que produziram peróxido de hidrogênio intracelular – São Paulo – 2011

Gráfico 4 – Valores das medianas dos macrófagos que expressaram CD14 e dos leucócitos que expressaram CH138 do leite que produziram peróxido de hidrogênio intracelular – São Paulo – 2011

Nas amostras de sangue não foram encontradas diferenças nas quantidades de células polimorfonucleares entre os grupos ($p>0,05$). Resultados semelhantes a estes foram obtidos quanto à quantidade de leucócitos CH138+ e de células polimorfonucleares CH138+ ($p>0,05$). Foram observadas que as células polimorfonucleares CH138+ das vacas do grupo LP apresentaram menor produção de peróxido de hidrogênio intracelular do que as vacas dos grupos negativos e AL ($p<0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas dos grupos negativo e AL. Não foram encontradas diferenças na intensidade de fluorescência das células polimorfonucleares CH138+ ($p>0,05$).

A figura 7 representa exemplos da identificação de células polimorfonucleares CH138+ do sangue de vacas dos grupos negativo, AL e LP que produziram peróxido de hidrogênio intracelular.

Figura 7 – Exemplos de identificação de células polimorfonucleares CH138+ do sangue de vacas que produziram peróxido de hidrogênio intracelular, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite não foram detectadas diferenças na quantidade de leucócitos, de células totais CH138+ e de leucócitos CH138+ entre os grupos ($p>0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maior produção de peróxido de hidrogênio intracelular pelos leucócitos CH138+ do que as vacas negativas ($p<0,05$), enquanto que esta produção foi semelhante entre as vacas dos grupos negativo e AL e entre os grupos AL e LP. Não foram encontradas diferenças das intensidades de fluorescências entre os grupos ($p>0,05$).

A figura 8 representa exemplos da identificação de leucócitos CH138+ do leite de vacas dos grupos negativo, AL e LP que produziram peróxido de hidrogênio intracelular.

Figura 8 – Exemplos de identificação de leucócitos CH138+ do leite de vacas que produziram peróxido de hidrogênio intracelular dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.2.4 Avaliação da fagocitose das amostras do sangue e do leite

Inicialmente estão apresentados os resultados da fagocitose das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ do leite. Posteriormente estão apresentados os resultados das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ do leite.

5.2.4.1 Fagocitose da SaPI pelas células mononucleares (CD14+) do sangue e pelos macrófagos (CD14+) do leite

Na tabela 10 estão representados os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ do leite que fagocitaram a SaPI.

Tabela 10 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ do leite que fagocitaram SaPI – São Paulo – 2011

			Grupos		
			N	AL	LP
Sangue	Mononucleares	Média	46,64 ^a	57,97 ^b	72,12 ^c
		Desvio padrão	(±14,44)	(±8,21)	(±9,98)
		Mediana	49,30	56,45	74,85
		(Mínimo - máximo)	(25,70-71,90)	(48,40-70,90)	(56,60-80,80)
	Leucócitos	Média	5,13 ^a	5,07 ^a	4,86 ^a
		Desvio padrão	(±1,06)	(±1,71)	(±1,56)
		Mediana	4,65	4,97	4,63
		(Mínimo - máximo)	(4,05-6,95)	(2,61-7,76)	(3,30-7,37)
	Mononucleares	Média	11,63 ^a	8,97 ^{ab}	7,09 ^b
		Desvio padrão	(±2,79)	(±3,72)	(±3,37)
		Mediana	11,40	7,68	6,14
		(Mínimo - máximo)	(8,14-15,90)	(5,19-16,00)	(4,13-13,00)
	CD14+	Média	64,77	62,85	47,03
		Desvio padrão	(±17,92)	(±24,77)	(13,05)
		Mediana	66,10 ^a	73,25 ^a	42,05 ^a
		(Mínimo - máximo)	(35,10-89,70)	(24,20-89,20)	(33,10-69,70)
	SaPI+	Média	62,30	46,30	29,60
		Desvio padrão	(±71,9)	(±39,9)	(±28,4)
		Mediana	27,60 ^a	40,40 ^a	16,90 ^a
		(Mínimo - máximo)	(6,2-186,00)	(6,1-119,00)	(12,6-85,40)
Total de amostras de sangue			09	10	06

			Grupos		
			N	AL	LP
Leite	Leucócitos	Média	90,74	89,68	85,60
		Desvio padrão	(±7,74)	(±6,09)	(±9,22)
		Mediana	92,95 ^a	92,10 ^a	83,65 ^a
		(Mínimo - máximo)	(66,20-99,00)	(72,90-96,90)	(71,70-99,50)
	CH138 -	Média	51,88	58,40	62,29
		Desvio padrão	(±20,08)	(±18,23)	(±14,93)
		Mediana	46,10 ^a	54,75 ^{ab}	66,20 ^b
		(Mínimo - máximo)	(21,90-95,10)	(23,10-86,00)	(22,40-80,20)
	Leucócitos	Média	58,35	65,23	74,30
		Desvio padrão	(±24,39)	(±19,99)	(±20,87)
		Mediana	50,55 ^a	62,30 ^{ab}	82,65 ^b
		(Mínimo - máximo)	(22,70-98,00)	(27,90-96,00)	(25,40-96,40)
	Leucócitos	Média	36,23	31,22	51,97
		Desvio padrão	(±20,96)	(±22,33)	(±24,87)
		Mediana	27,45 ^a	24,85 ^a	61,90 ^b
		(Mínimo - máximo)	(9,14-74,80)	(1,89-69,80)	(12,40-81,50)
	CH138 -	Média	61,96	45,52	65,87
		Desvio padrão	(±18,60)	(±25,80)	(±20,15)
		Mediana	64,85 ^a	49,50 ^b	69,65 ^a
		(Mínimo - máximo)	(9,33-85,80)	(2,05-83,80)	(30,50-91,10)
	SaPI+	Média	37,42	35,67	33,66
		Desvio padrão	(±17,09)	(±19,63)	(±21,44)
		Mediana	36,10 ^a	29,60 ^a	25,20 ^a
		(Mínimo - máximo)	(5,32-81,90)	(12,60-81,00)	(2,17-80,60)
	Intensidade de Fagocitose	Média	23,92	13,99	34,3
		Desvio padrão	(±20,76)	(±6,80)	(±50,1)
		Mediana	16,60 ^a	12,15 ^a	10,7 ^a
		(Mínimo - máximo)	(3,36-90,50)	(5,48-33,00)	(2,10-183,0)
Total de amostras de leite			36	40	24

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas (p<0,05)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CD14+/Leucócitos: valores da expressão de CD14+ em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CD14+/Mononucleares: expressão de CD14 em relação a população de células mononucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulosidade (FSC x SSC)

CH138-/Células totais: valores da quantidade de células que não expressaram CH138- em relação a células totais do leite

CH138-/Leucócitos: valores da quantidade de células que não expressaram CH138- em relação aos leucócitos lácteos

CD14+/Leucócitos: valores da expressão de CD14 em relação aos leucócitos do leite

CD14+/CH138-: valores da expressão de CD14 em relação a população de CH138- do leite

Nas amostras de sangue, as vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de células mononucleares do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$). As vacas do grupo AL apresentaram maiores quantidades de células mononucleares do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$). Não foram constatadas diferenças na quantidade de leucócitos CD14⁺ entre os grupos ($p > 0,05$). Foram observados que as vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de células mononucleares CD14⁺ do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$), mas estas diferenças não foram observadas entre as vacas dos grupos negativo e AL e entre as vacas dos grupos AL e LP ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças na fagocitose de SaPI pelas células mononucleares CD14⁺ entre os diferentes grupos. Da mesma forma que não foram observadas diferenças quanto a intensidade de fagocitose das células mononucleares CD14⁺ entre os grupos ($p > 0,05$).

A figura 9 representa exemplos da identificação de células mononucleares CD14⁺ do sangue de vacas dos grupos negativo, AL e LP que fagocitaram SaPI.

Figura 9 – Exemplos de identificação de células mononucleares CD14⁺ do sangue de vacas que fagocitaram SaPI, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite não foram detectadas diferenças nas quantidades de leucócitos entre os grupos ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maiores quantidades de células totais CH138⁺ e de leucócitos que não expressaram CH138 do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$). Entre as vacas do grupo negativo e AL e entre as vacas dos grupos AL e LP não foram encontradas diferenças ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de leucócitos CD14⁺ do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$). As vacas do grupo AL apresentaram menor quantidade de leucócitos que não expressaram

CH138 do que as vacas dos grupos negativo e LP ($p < 0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas dos grupos negativo e LP ($p > 0,05$). Não foram encontradas diferenças entre os grupos nas quantidades de macrófagos CD14⁺ que fagocitaram SaPI ($p > 0,05$).

A figura 10 representa exemplos da identificação de macrófagos (CD14⁺) do leite de vacas dos grupos negativo, AL e LP que fagocitaram SaPI.

Figura 10 – Exemplos de identificação de macrófagos CD14⁺ do leite de vacas que fagocitaram SaPI, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.2.4.2 Fagocitose da *E.coli* pelas células mononucleares CD14⁺ do sangue e pelos macrófagos (CD14⁺) do leite

Na tabela 11 estão representados os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células mononucleares CD14⁺ do sangue e dos macrófagos CD14⁺ do leite que fagocitaram a *E.coli*.

Tabela 11 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ do leite que fagocitaram a *E.coli* nos diferentes grupos de LEB – São Paulo – 2011

				Grupos	
				AL	LP
				N	
Sangue	Mononucleares	Média	45,02 ^a	54,24 ^a	65,23 ^b
		Desvio padrão	(±14,81)	(±7,92)	(±9,90)
		Mediana	47,30	53,45	65,40
		(Mínimo - máximo)	(24,00-71,90)	(44,60-67,50)	(52,00-76,70)
	Leucócitos	Média	5,21 ^a	5,39 ^a	4,69 ^a
		Desvio padrão	(±1,64)	(±1,74)	(±1,01)
		Mediana	5,71	5,73	4,62
		(Mínimo - máximo)	(2,88-7,98)	(2,10-7,54)	(3,37-6,31)
	Mononucleares	Média	11,98 ^a	10,03 ^{ab}	7,47 ^b
		Desvio padrão	(±2,66)	(±3,52)	(±2,68)
		Mediana	12,40	10,22	6,24
		(Mínimo - máximo)	(5,87-15,50)	(4,51-15,90)	(5,06-12,10)
	CD14+	Média	38,36	48,75	26,48
		Desvio padrão	(±20,40)	(±21,92)	(±10,26)
		Mediana	28,40 ^a	48,10 ^{ab}	22,10 ^{ac}
		(Mínimo - máximo)	(21,40-69,90)	(20,20-77,60)	(17,60-44,50)
	<i>E.coli</i> +	Média	14,65	16,05	5,78
		Desvio padrão	(±18,44)	(±13,19)	(±2,57)
		Mediana	4,32 ^a	11,95 ^a	5,58 ^a
(Mínimo - máximo)		(2,60-49,50)	(3,06-42,60)	(3,04-9,94)	
Total de amostras de sangue			09	10	06

				Grupos	
				AL	LP
				N	
Leite	Leucócitos	Média	89,79	88,60	84,30
		Desvio padrão	(±8,28)	(±6,50)	(±9,91)
		Mediana	92,75 ^a	90,80 ^a	83,65 ^b
		(Mínimo - máximo)	(65,40-99,00)	(70,50-97,00)	(70,70-99,50)
	CH138-	Média	52,71	58,49	61,40
		Desvio padrão	(±19,18)	(±19,74)	(±17,40)
		Mediana	50,70 ^a	57,65 ^{ab}	68,65 ^b
		(Mínimo - máximo)	(14,30-95,00)	(14,70-89,00)	(18,40-81,60)
	Leucócitos	Média	60,02	66,10	75,02
		Desvio padrão	(±23,88)	(±21,55)	(±24,87)
		Mediana	53,65 ^a	67,25 ^a	86,35 ^b
		(Mínimo - máximo)	(14,90-98,50)	(16,90-95,00)	(18,50-99,40)
	Leucócitos	Média	35,50	31,16	46,37
		Desvio padrão	(±21,85)	(±22,47)	(±26,99)
		Mediana	27,35 ^a	25,20 ^{ab}	53,75 ^{ac}
		(Mínimo - máximo)	(4,00-77,80)	(1,82-82,10)	(5,13-85,70)
	CH138-	Média	57,70	45,40	55,88
		Desvio padrão	(±19,90)	(±25,18)	(±22,71)
		Mediana	57,75 ^a	51,75 ^a	56,45 ^a
		(Mínimo - máximo)	(4,06-86,20)	(1,93-89,40)	(20,70-88,00)
	CD14+	Média	36,09 ^a	25,22 ^b	37,73 ^a
		Desvio padrão	(±17,36)	(±12,95)	(±19,66)
		Mediana	32,15	23,85	33,95
		(Mínimo - máximo)	(10,80-78,50)	(3,55-63,50)	(8,22-81,50)
	<i>E.coli</i> +	Média	6,78	7,25	11,90
		Desvio padrão	(±4,59)	(±4,48)	(±12,57)
		Mediana	5,44 ^a	5,62 ^a	6,17 ^a
		(Mínimo - máximo)	(1,86-18,40)	(2,69-22,70)	(2,30-50,20)
Total de amostras de leite			36	40	24

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas (p<0,05)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CD14+/Leucócitos: valores da expressão de CD14 em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CD14+/Mononucleares: expressão de CD14 em relação a população de células mononucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulosidade (FSC x SSC)

CH138-/Células totais: valores da quantidade de células que não expressaram CH138 em relação a células totais do leite

CH138-/Leucócitos: valores da quantidade de células que não expressaram CH138 em relação aos leucócitos lácteos

CD14+/Leucócitos: valores da expressão de CD14 em relação aos leucócitos do leite

CD14+/CH138-: valores da expressão de CD14 em relação a população de CH138- do leite

No gráfico 5 estão representadas as medianas das células mononucleares CD14+ do sangue que fagocitaram SaPI e *E.coli* e no gráfico 6 estão representadas as medianas dos leucócitos CD14+ do leite que fagocitaram SaPI e *E.coli*.

Gráfico 5 – Valores das medianas das células mononucleares CD14+ do sangue que fagocitaram SaPI e *E.coli* – São Paulo – 2011

Gráfico 6 – Valores das medianas dos macrófagos CD14+ das amostras de leite que fagocitaram SaPI e *E.coli* – São Paulo – 2011

Nas amostras de sangue, as vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de células mononucleares do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$). Estas diferenças não foram encontradas entre as vacas do grupo negativo e AL ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças na quantidade de leucócitos CD14+ entre os grupos ($p > 0,05$).

Nas vacas do grupo LP foram observadas que as quantidades de células mononucleares CD14⁺ foram menores do que nas vacas do grupo negativo ($p < 0,05$), diferenças que não foram encontradas entre as vacas do grupo negativo e AL e entre as vacas dos grupos AL e LP ($p > 0,05$). Foram observados que as vacas do grupo LP apresentaram menores índices de fagocitose de *E.coli* pelas células mononucleares CD14⁺ do que as vacas do grupo AL. Não foram observadas diferenças entre as vacas dos grupos negativos e AL e entre negativos e LP ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças quanto a intensidade de fagocitose pelas células mononucleares CD14⁺ ($p > 0,05$).

A figura 11 ilustra exemplos da identificação de células mononucleares CD14⁺ do sangue de vacas dos grupos negativo, AL e LP que fagocitaram *E.coli*.

Figura 11 – Exemplos de identificação de células mononucleares CD14⁺ do sangue de vacas que fagocitaram *E.coli*, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite, as vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de leucócitos do que as vacas do grupo negativo e AL ($p > 0,05$). Foi observado que as quantidades de células totais que não expressaram CH138 (CH138⁻) foram maiores nas vacas do grupo LP do que nas vacas do grupo negativo ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre as vacas dos grupos negativo e AL e entre as vacas dos grupos AL e LP ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maiores quantidades de leucócitos que não expressaram CH138 (CH138⁻) do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maiores quantidades de leucócitos (CD14⁺) do que as vacas do grupo AL ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre as vacas dos grupos negativo e AL e entre as vacas dos grupos negativo e LP ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças da quantidade de

macrófagos CD14⁺ entre os grupos ($p>0,05$). Foram detectadas que as vacas do grupo AL apresentaram menores quantidades de macrófagos CD14⁺ que fagocitaram *E.coli* do que as vacas dos grupos negativo e LP ($p<0,05$). Não foram encontradas diferenças entre as vacas dos grupos negativo e LP ($p>0,05$). Quanto a intensidade de fagocitose, não foram observadas diferenças entre os grupos ($p>0,05$).

A figura 12 demonstra exemplos da identificação de macrófagos CD14⁺ do leite de vacas dos grupos negativo, AL e LP que fagocitaram *E.coli*, respectivamente.

Figura 12 – Exemplos de identificação de macrófagos CD14⁺ do leite de vacas que fagocitaram *E.coli*, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.2.4.3 Fagocitose da SaPI pelas células polimorfonucleares CH138⁺ do sangue e pelos leucócitos CH138⁺ do leite.

Na tabela 12 estão representados os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células polimorfonucleares CH138⁺ do sangue e dos leucócitos CH138⁺ das amostras de leite que fagocitaram a SaPI.

Tabela 12 - Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ das amostras de leite que fagocitaram a SaPI entre os diferentes grupos experimentais – São Paulo – 2011

			N	Grupos AL	LP
Sangue	Polimorfonucleares	Média	22,06 ^a	29,10 ^a	21,19 ^a
		Desvio padrão	(±8,46)	(±8,51)	(±9,36)
		Mediana	22,90	26,85	21,15
		(Mínimo - máximo)	(13,10-34,50)	(19,10-45,60)	(8,31-35,10)
	Leucócitos	Média	18,50 ^a	24,76 ^a	18,15 ^a
		Desvio padrão	(±7,85)	(±9,47)	(±7,38)
		Mediana	16,00	24,15	19,60
		(Mínimo - máximo)	(9,49-30,50)	(9,98-45,30)	(7,81-25,60)
	Polimorfonucleares	Média	84,40	85,15	87,05
		Desvio padrão	(±14,61)	(±19,36)	(±10,81)
		Mediana	88,40 ^a	93,95 ^a	91,50 ^a
		(Mínimo - máximo)	(51,10-96,50)	(37,20-99,20)	(72,30-96,60)
	SaPI+	Média	79,70 ^a	65,84 ^{ab}	39,90 ^b
		Desvio padrão	(±12,10)	(±27,72)	(±29,5)
		Mediana	81,40	71,70	27,60
		(Mínimo - máximo)	(56,10-97,10)	(14,70-95,30)	(8,8-79,8)
	Intensidade de fagocitose	Média	301,00	164,20	113,80
		Desvio padrão	(±367)	(±148,9)	(±179,3)
		Mediana	146,00 ^a	131,00 ^a	31,30 ^a
		(Mínimo - máximo)	(11-1186,00)	(1,0-394,00)	(3,0-465,00)
Total de amostras de sangue			09	10	06
			N	Grupos AL	LP
Leite	Leucócitos	Média	90,03	89,67	85,66
		Desvio padrão	(±7,72)	(±6,07)	(±9,29)
		Mediana	91,95 ^a	92,05 ^a	83,6 ^a
		(Mínimo - máximo)	(66,20-99,30)	(72,90-96,90)	(71,70-99,40)
	Células totais	Média	32,03	27,24	21,84
		Desvio padrão	(±21,96)	(±15,79)	(±22,59)
		Mediana	32,60 ^a	26,75 ^a	10,95 ^b
		(Mínimo - máximo)	(1,31-76,30)	(6,54-53,90)	(3,78-77,40)
	Leucócitos	Média	34,45	53,20	23,83
		Desvio padrão	(±22,43)	(±142,5)	(±22,65)
		Mediana	34,20 ^a	32,40 ^a	14,70 ^b
		(Mínimo - máximo)	(1,35-76,90)	(7,1-926,0)	(4,83-78,00)
	SaPI+	Média	54,66 ^a	55,05 ^a	56,35 ^a
		Desvio padrão	(±15,14)	(±19,38)	(±14,58)
		Mediana	54,00	59,10	55,35
		(Mínimo - máximo)	(13,30-78,90)	(19,10-88,30)	(14,00-83,70)
	Intensidade de fagocitose	Média	92,33	73,13	62,32
		Desvio padrão	(±56,84)	(±57,91)	(±42,45)
		Mediana	68,65 ^a	53,25 ^b	39,20 ^b
		(Mínimo - máximo)	(19,10-265,00)	(4,26-212,00)	(9,17-158,00)
Total de amostras de leite			36	40	24

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CH138+/Leucócitos: valores da expressão de CH138 em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CH138+/Polimorfonucleares: expressão de CH138 em relação a população de células polimorfonucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulosidade (FSC x SSC)

CH138+/Células totais: valores da expressão de CH138 em relação às células totais do leite

CH138+/Leucócitos: valores da expressão de CH138 em relação a população de leucócitos do leite

Nas amostras de sangue não foram encontradas diferenças na quantidade de células polimorfonucleares, na quantidade de leucócitos CH138+ e na quantidade de células polimorfonucleares CH138+ entre os grupos ($p>0,05$). Nas vacas do grupo LP foram observados menores índices de fagocitose de SaPI pelas células polimorfonucleares (CH138+) do que nas vacas do grupo negativo ($p<0,05$), diferenças que não foram detectadas entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p>0,05$). Não foram encontradas diferenças na intensidade de fagocitose nos diferentes grupos ($p>0,05$).

A figura 13 representa exemplos da identificação de células polimorfonucleares CH138+ do sangue de vacas dos grupos negativo, AL e LP que fagocitaram SaPI, respectivamente.

Figura 13 – Exemplos de identificação de células polimorfonucleares CH138+ do sangue de vacas que fagocitaram SaPI, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite, não foram observadas diferenças na quantidade de leucócitos entre os grupos ($p>0,05$). Foram observados que as vacas do grupo LP apresentaram menores quantidades de células totais CH138+ e de leucócitos CH138+ do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p<0,05$). Não foram encontradas diferenças entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p>0,05$). Quanto a fagocitose, não foram observadas diferenças na quantidade de leucócitos CH138+ que fagocitaram SaPI entre os grupos ($p>0,05$), mas foi observado que as vacas dos grupos AL e LP apresentaram menor intensidade de fagocitose do que as vacas do grupo negativo ($p<0,05$). Enquanto que as vacas dos grupos AL e LP foram semelhantes ($p>0,05$).

A figura 14 representa exemplos da identificação de leucócitos CH138+ do leite de vacas dos grupos negativo, AL e LP que fagocitaram SaPI.

Figura 14 – Exemplos de identificação de leucócitos CH138+ do leite de vacas que fagocitaram SaPI, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.2.4.4 Fagocitose da *E.coli* pelas células polimorfonucleares CH138+ do sangue e pelos leucócitos CH138+ do leite

Na tabela 13 estão representados os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ das amostras de leite que fagocitaram *E.coli*.

Tabela 13 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ do leite que fagocitaram *E.coli* entre os grupos experimentais – São Paulo – 2011

			Grupos		
			N	AL	LP
Sangue	Polimorfonucleares	Média	30,49 ^a	33,15 ^a	25,15 ^a
		Desvio padrão	(±11,12)	(±8,69)	(±10,72)
		Mediana	29,10	32,20	23,55
		(Mínimo - máximo)	(14,40-44,20)	(22,90-48,20)	(11,60-38,90)
	Leucócitos	Média	28,80 ^a	29,54 ^a	22,17 ^a
		Desvio padrão	(±11,48)	(±11,37)	(±9,17)
		Mediana	28,10	28,75	21,90
		(Mínimo - máximo)	(10,60-43,10)	(6,81-47,90)	(11,30-34,80)
	Polimorfonucleares	Média	93,08	87,23	89,25
		Desvio padrão	(±8,07)	(±21,64)	(±10,16)
		Mediana	96,40 ^a	96,85 ^a	93,35 ^a
		(Mínimo - máximo)	(73,30-99,80)	(29,80-99,50)	(76,40-97,80)
	<i>E.coli</i> +	Média	26,28	34,72	16,36
		Desvio padrão	(±16,91)	(±20,86)	(±19,72)
		Mediana	24,00 ^a	27,10 ^{ab}	8,04 ^{ac}
		(Mínimo - máximo)	(7,46-48,60)	(12,20-76,10)	(3,38-55,30)
	Intensidade de fagocitose	Média	5,97	18,09	2,13
		Desvio padrão	(±9,34)	(±20,55)	(±2,24)
		Mediana	1,01 ^a	14,80 ^{ab}	1,01 ^{ac}
		(Mínimo - máximo)	(1,01-27,40)	(1,01-66,40)	(1,01-6,61)
Total de amostras de sangue			09	10	06
			Grupos		
			N	AL	LP
Leite	Leucócitos	Média	89,54	88,58	84,34
		Desvio padrão	(±8,14)	(±6,47)	(±9,94)
		Mediana	92,15 ^a	91,00 ^a	83,65 ^a
		(Mínimo - máximo)	(65,40-98,40)	(70,50-97,00)	(70,70-99,30)
	Células totais	Média	26,16	24,84	21,26
		Desvio padrão	(±20,45)	(±16,57)	(±22,98)
		Mediana	17,05 ^a	22,75 ^a	9,46 ^a
		(Mínimo - máximo)	(0,75-74,50)	(4,08-60,90)	(0,41-75,70)
	Leucócitos	Média	28,50	28,05	23,27
		Desvio padrão	(±21,28)	(±18,31)	(±23,51)
		Mediana	19,20 ^a	26,15 ^a	12,46 ^a
		(Mínimo - máximo)	(0,77-77,70)	(4,33-70,00)	(0,53-76,60)
	<i>E.coli</i> +	Média	41,00	33,31	46,14
		Desvio padrão	(±15,54)	(±19,53)	(±13,12)
		Mediana	41,65 ^a	28,85 ^b	44,45 ^a
		(Mínimo - máximo)	(9,32-73,80)	(2,24-88,10)	(24,70-74,60)
	Intensidade de fagocitose	Média	21,91	17,16	16,58
		Desvio padrão	(±21,76)	(±14,99)	(±8,14)
		Mediana	18,35 ^a	14,65 ^a	16,50 ^a
		(Mínimo - máximo)	(1,01-105,00)	(1,01-52,90)	(1,80-35,40)
Total de amostras de leite			36	40	24

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CH138+/Leucócitos: valores da expressão de CH138 em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CH138+/Polimorfonucleares: expressão de CH138 em relação a população de células polimorfonucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulosidade (FSC x SSC)

CH138+/Células totais: valores da expressão de CH138 em relação as células totais do leite

CH138+/Leucócitos: valores da expressão de CH138 em relação a população de leucócitos lácteos

No gráfico 7 estão representadas as médias das células polimorfonucleares CH138+ das amostras de sangue que fagocitaram SaPI e *E.coli* e no Gráfico 8 estão representadas as médias dos leucócitos CH138+ das amostras de leite que fagocitaram SaPI e *E.coli*.

Gráfico 7 – Valores médios das células polimorfonucleares CH138+ das amostras de sangue que fagocitaram SaPI e *E.coli* – São Paulo – 2011

Gráfico 8 – Valores médios dos leucócitos CH138+ das amostras de leite que fagocitaram SaPI e *E.coli* – São Paulo – 2011

Nas amostras de sangue, não foram constatadas diferenças da quantidade de células polimorfonucleares, na quantidade de leucócitos CH138+ e na quantidade de células polimorfonucleares CH138+ entre os grupos ($p > 0,05$). Mas na fagocitose, foram observados

que as vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de células polimorfonucleares CH138+ e menor intensidade de fagocitose do que as vacas do grupo AL ($p < 0,05$), diferença que não foi observada entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$).

A figura 15 representa exemplos da identificação de células polimorfonucleares (CH138+) do sangue de vacas dos grupos negativo, AL e LP que fagocitaram *E.coli*+

Figura 15 – Exemplos de identificação de células polimorfonucleares (CH138+) do sangue de vacas que fagocitaram *E.coli*, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite, não foram observadas diferenças na quantidade de leucócitos, na quantidade de células totais CH138+ e na quantidade de leucócitos CH138+ entre os grupos ($p > 0,05$). As vacas do grupo AL apresentaram menor quantidade de leucócitos CH138+ que fagocitaram *E.coli* do que as vacas dos grupos negativo e LP ($p < 0,05$). Entre as vacas dos grupos negativo e LP não foram encontradas diferenças ($p > 0,05$). Não foram encontradas diferenças quanto a intensidade de fagocitose ($p > 0,05$).

A figura 16 representa exemplos da identificação de leucócitos CH138+ do leite de vacas dos grupos negativo, AL e LP que fagocitaram *E.coli*.

Figura 16 – Exemplos de identificação de leucócitos CH138+ do leite de vacas que fagocitaram *E.coli*, dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.2.5 Avaliação da morte celular dos fagócitos sanguíneos e lácteos

Inicialmente estão apresentados os resultados da morte das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ do leite. Posteriormente estão apresentados os resultados das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos (CH138+) do leite.

5.2.5.1 Morte celular das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ do leite

Nas tabelas 14 e 15 estão representados os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo da morte celular das células mononucleares CD14+ do sangue e dos macrófagos CD14+ das amostras de leite, respectivamente.

Tabela 14 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo da morte das células mononucleares CD14+ do sangue entre os grupos experimentais – São Paulo – 2011

			N	Grupos AL	LP
Sangue	Mononucleares	Média	62,94 ^a	66,19 ^a	81,12 ^b
		Desvio padrão	(±10,45)	(±12,69)	(±6,85)
		Mediana	64,80	65,75	80,75
		(Mínimo - máximo)	(47,10-78,20)	(42,60-82,50)	(73,50-89,10)
	Leucócitos	Média	4,38 ^a	3,95 ^a	3,09 ^a
		Desvio padrão	(±1,962)	(±1,104)	(±1,420)
		Mediana	3,94	3,98	3,38
		(Mínimo - máximo)	(2,38-7,95)	(2,32-5,57)	(1,25-4,51)
	Mononucleares	Média	6,93 ^a	6,08 ^a	3,87 ^b
		Desvio padrão	(±2,650)	(±1,845)	(±1,816)
		Mediana	6,75	5,83	4,30
		(Mínimo - máximo)	(3,91-10,70)	(3,53-10,30)	(1,40-5,81)
	Apoptose	Média	2,93 ^a	3,32 ^a	2,21 ^a
		Desvio padrão	(±1,689)	(±1,689)	(±0,571)
		Mediana	2,91	3,16	2,05
		(Mínimo - máximo)	(1,04-6,69)	(1,21-5,88)	(1,63-3,19)
	Necrose	Média	13,08 ^a	12,65 ^a	3,24 ^b
		Desvio padrão	(±5,49)	(±5,34)	(±1,53)
		Mediana	12,80	11,90	2,74
		(Mínimo - máximo)	(5,78-20,50)	(4,85-23,10)	(1,87-5,14)
	Apoptose e/ou necrose	Média	0,57	2,28	0,14
		Desvio padrão	(±0,29)	(±1,90)	(±0,09)
		Mediana	0,53 ^a	1,80 ^b	0,10 ^c
		(Mínimo - máximo)	(0,12-1,17)	(0,17-5,44)	(0,08-0,32)
	Viabilidade	Média	83,42 ^a	81,93 ^a	94,40 ^b
		Desvio padrão	(±5,34)	(±5,81)	(±2,071)
		Mediana	81,10	80,80	94,95
		(Mínimo - máximo)	(77,70-91,90)	(74,20-93,00)	(91,30-96,40)
Total de amostras de sangue			09	10	06

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CD14+/Leucócitos: valores da expressão de CD14 em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CD14+/Mononucleares: expressão de CD14 em relação a população de células mononucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulocidade (FSC x SSC)

No gráfico 9 estão representadas as médias das células mononucleares CD14+ das amostras de sangue que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis.

Gráfico 9 – Valores médios das células mononucleares CD14+ das amostras de sangue que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis – São Paulo – 2011

Tabela 15 - Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo dos macrófagos CD14+ das amostras de leite entre os grupos experimentais – São Paulo – 2011

			Grupos		
			N	AL	LP
Leite	Leucócitos	Média	80,27	80,95	78,83
		Desvio padrão	(±14,48)	(±9,38)	(±14,15)
		Mediana	85,70 ^a	81,2 ^a	83,45 ^a
		(Mínimo - máximo)	(49,40-98,00)	(48,20-95,70)	(55,70-99,20)
	Macrófagos	Média	30,80 ^a	40,39 ^b	38,95 ^b
		Desvio padrão	(±11,88)	(±13,48)	(±14,90)
		Mediana	30,30	39,70	37,85
		(Mínimo - máximo)	(10,90-73,00)	(9,40-64,80)	(14,50-62,60)
	Leucócitos	Média	38,60 ^a	49,04 ^b	48,47 ^b
		Desvio padrão	(±12,64)	(±13,75)	(±14,04)
		Mediana	38,75	48,70	47,40
		(Mínimo - máximo)	(12,70-76,30)	(19,50-75,50)	(19,30-71,90)
	Leucócitos	Média	17,79	22,11	21,84
		Desvio padrão	(±8,73)	(±10,39)	(±9,36)
		Mediana	18,40 ^a	21,20 ^{ab}	23,95 ^b
		(Mínimo - máximo)	(0,36-47,60)	(0,17-52,60)	(4,67-36,70)
	Macrófagos	Média	45,90 ^a	46,23 ^a	47,55 ^a
		Desvio padrão	(±18,28)	(±19,90)	(±22,67)
		Mediana	50,60	48,55	43,80
		(Mínimo - máximo)	(2,86-80,70)	(0,53-80,70)	(11,90-83,60)
	Apoptose	Média	54,49	31,80	31,18
		Desvio padrão	(±16,98)	(±16,91)	(±12,98)
		Mediana	56,00 ^a	32,95 ^b	33,25 ^b
		(Mínimo - máximo)	(5,50-81,30)	(5,11-73,80)	(8,59-62,30)
	Necrose	Média	4,78	7,68	9,86
		Desvio padrão	(±5,90)	(±9,15)	(±7,18)
		Mediana	2,41 ^a	4,36 ^b	7,52 ^c
		(Mínimo - máximo)	(0,04-26,10)	(0,20-34,70)	(1,61-30,30)
	Apoptose e/ou necrose	Média	12,92	19,38	19,13
		Desvio padrão	(±6,26)	(±18,41)	(±8,28)
		Mediana	11,50 ^a	12,75 ^{ab}	18,65 ^b
		(Mínimo - máximo)	(3,82-27,20)	(1,01-77,80)	(8,94-42,40)
	Viabilidade	Média	27,78	41,15	39,83
		Desvio padrão	(±12,92)	(±22,43)	(±13,08)
		Mediana	25,35 ^a	41,75 ^b	41,25 ^b
		(Mínimo - máximo)	(7,51-58,90)	(1,83-85,00)	(19,10-62,40)
Total de amostras de leite			36	40	24

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Macrófagos/Células totais: valores de macrófagos em relação as células totais do leite

Macrófagos/Leucócitos: valores de macrófagos em relação a população de leucócitos lácteos

CD14+/Leucócitos: valores da expressão de CD14 em relação as células totais do leite

CD14+/Macrófagos: valores da expressão de CD14 em relação a população de leucócitos lácteos

No gráfico 10 estão representadas as medianas dos leucócitos CD14+ das amostras de leite que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis.

Gráfico 10 – Valores das medianas dos macrófagos CD14+ das amostras de leite que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis – São Paulo – 2011

Diante dos resultados obtidos, pode-se observar que as vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de células mononucleares do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$), diferença que não foi encontrada quando se comparou as vacas dos grupos negativos e AL ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças na quantidade de leucócitos CD14+ entre os grupos ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram menores quantidades de células mononucleares CD14+ do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças na morte celular por apoptose das células mononucleares CD14+ entre os grupos ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de células mononucleares CD14+ que sofreram necrose do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram menores quantidades de células mononucleares CD14+ que sofreram morte por apoptose e/ou necrose do que as vacas dos grupos negativos e AL ($p < 0,05$), e as vacas do grupo AL apresentaram maior quantidade de células mononucleares CD14+ que sofreram apoptose e/ou necrose do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$). Por esta razão, pode-se observar que as vacas do grupo LP apresentaram maior viabilidade de células mononucleares CD14+ do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$), diferenças que não foram detectadas entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$).

A figura 17 ilustra exemplos da identificação de células mononucleares CD14+ do sangue de vacas dos grupos negativo, AL e LP que sofreram morte celular.

Figura 17 – Exemplos de identificação de células mononucleares CD14⁺ do sangue de vacas que sofreram morte celular por apoptose (Q1), por apoptose e/ou necrose (Q2) e por necrose (Q3) e das células viáveis (Q4), dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite não foram encontradas diferenças na quantidade de leucócitos entre os grupos ($p>0,05$). Foi observada que as vacas dos grupos AL e LP apresentaram maiores quantidades de macrófagos em relação às células totais e em relação aos leucócitos do que as vacas do grupo negativo ($p<0,05$), não foram observadas diferenças entre as vacas dos grupos AL e LP ($p>0,05$). Foi observada que as vacas do grupo LP apresentaram maiores quantidades de leucócitos CD14⁺ do que as vacas do grupo negativo ($p<0,05$). Não foram observadas diferenças entre as vacas dos grupos negativo e AL e entre as vacas dos grupos AL e LP ($p>0,05$). Não foram observadas diferenças na quantidade de macrófagos CD14⁺ entre os grupos ($p>0,05$). Na morte celular, as vacas dos grupos AL e LP apresentaram menor quantidade de macrófagos CD14⁺ que sofreram morte por apoptose do que as vacas do grupo negativo ($p<0,05$), não foi observada diferença entre as vacas dos grupos AL e LP ($p>0,05$). Foram observadas que as vacas dos grupos AL e LP apresentaram maior quantidade de macrófagos CD14⁺ que sofreram morte celular por necrose do que as vacas do grupo negativo ($p<0,05$), e as vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de macrófagos CD14⁺ que sofreram necrose do que as vacas do grupo AL ($p<0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maiores quantidades de macrófagos (CD14⁺) que sofreram morte por apoptose e/ou necrose do que as vacas do grupo negativo ($p<0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas dos grupos negativo e AL e entre as vacas dos grupos AL e LP ($p>0,05$). Desta forma, foi observada que as vacas dos grupos AL e LP apresentaram maior

viabilidade de macrófagos CD14+ do que as vacas do grupo negativo ($p<0,05$), diferenças que não foram encontradas entre as vacas dos grupos AL e LP ($p>0,05$).

A figura 18 representa exemplos da identificação de macrófagos (CD14+) do leite de vacas dos grupos negativo, AL e LP que sofreram morte celular.

Figura 18 – Exemplos de identificação de macrófagos (CD14+) do leite de vacas que sofreram morte celular por apoptose (Q1), por apoptose e/ou necrose (Q2) e por necrose (Q3) e das células viáveis (Q4), dos grupos negativo (a), AL(b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.2.5.2 Morte celular das células polimorfonucleares CH138+ do sangue e dos leucócitos CH138+ do leite

Nas tabelas 16 e 17 estão representados os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativos da morte celular das células polimorfonucleares CH138+ das amostras do sangue e dos leucócitos CH138+ das amostras de leite, respectivamente.

Tabela 16 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativos da morte celular das células polimorfonucleares CH138+ das amostras do sangue nos diferentes grupos experimentais – São Paulo – 2011

			N	Grupos	
				AL	LP
Sangue	Polimorfonucleares	Média	15,04 ^a	18,49 ^a	9,55 ^a
		Desvio padrão	(±7,44)	(±9,00)	(±4,33)
		Mediana	13,90	16,35	7,88
		(Mínimo - máximo)	(3,56-25,40)	(4,95-36,80)	(5,33-16,60)
	Leucócitos	Média	11,34	13,93	6,60
		Desvio padrão	(±6,90)	(±8,57)	(±4,66)
		Mediana	10,40 ^a	13,40 ^a	4,74 ^a
		(Mínimo - máximo)	(3,03-22,40)	(4,31-33,80)	(3,56-15,90)
	Polimorfonucleares	Média	73,62	76,59	70,20
		Desvio padrão	(±19,01)	(±26,39)	(±26,80)
		Mediana	77,40 ^a	89,75 ^a	76,00 ^a
		(Mínimo - máximo)	(36,20-93,90)	(30,00-98,60)	(27,60-95,60)
	Apoptose	Média	2,40	1,90	1,71
		Desvio padrão	(±1,87)	(±0,79)	(±0,28)
		Mediana	1,28 ^a	1,67 ^a	1,83 ^a
		(Mínimo - máximo)	(1,18-5,84)	(1,08-3,27)	(1,34-1,95)
	Necrose	Média	8,01	3,78	1,99
		Desvio padrão	(±6,52)	(±2,84)	(±2,13)
		Mediana	5,32 ^a	3,22 ^{ab}	1,02 ^b
		(Mínimo - máximo)	(2,56-21,80)	(0,38-10,50)	(0,57-6,12)
	Apoptose e/ou necrose	Média	1,35 ^a	0,52 ^{ab}	0,21 ^b
		Desvio padrão	(±1,24)	(±0,41)	(±0,09)
		Mediana	1,08	0,47	0,19
		(Mínimo - máximo)	(0,05-4,13)	(0,10-1,45)	(0,07+0,36)
	Viabilidade	Média	88,23	93,80	96,06
		Desvio padrão	(±8,01)	(±3,39)	(±2,28)
		Mediana	89,70 ^a	93,85 ^{ab}	96,95 ^b
		(Mínimo - máximo)	(74,50-96,20)	(85,50-97,60)	(91,60-97,70)
Total de amostras de sangue			09	10	06

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CH138+/Leucócitos: valores da expressão de CH138 em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CH138+/Polimorfonucleares: expressão de CH138 em relação a população de células polimorfonucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulosidade (FSC x SSC)

No gráfico 11 estão representadas as medianas das células polimorfonucleares CH138+ das amostras de sangue que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis.

Gráfico 11 – Valores das medianas das células polimorfonucleares CH138+ das amostras de sangue que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis – São Paulo – 2011

Tabela 17 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo da morte celular dos leucócitos CH138+ das amostras de leite nos diferentes grupos experimentais – São Paulo – 2011

			N	Grupos AL	LP
Leite	Leucócitos	Média	78,98	82,16	79,69
		Desvio padrão	(±14,97)	(±7,72)	(±14,25)
		Mediana	85,00 ^a	82,60 ^a	83,60 ^a
		(Mínimo - máximo)	(45,60-97,90)	(66,70-95,70)	(±55,60-99,30)
	Células totais	Média	17,28	24,19	16,89
		Desvio padrão	(±19,89)	(±15,27)	(±18,56)
		Mediana	10,84 ^a	21,75 ^b	11,05 ^a
		(Mínimo - máximo)	(0,34-77,80)	(2,37-52,40)	(2,03-63,50)
	Leucócitos	Média	20,36	28,83	19,39
		Desvio padrão	(±20,62)	(±17,20)	(±19,10)
		Mediana	15,35 ^a	26,40 ^b	12,35 ^a
		(Mínimo - máximo)	(0,40-83,50)	(2,92-65,00)	(2,67-71,10)
	Apoptose	Média	35,08	20,64	15,90
		Desvio padrão	(±19,56)	(±14,21)	(±8,97)
		Mediana	34,85 ^a	17,65 ^b	15,60 ^b
		(Mínimo - máximo)	(3,90-80,60)	(0,35-57,10)	(2,26-44,70)
	Necrose	Média	9,90	13,71	14,18
		Desvio padrão	(±6,25)	(±12,43)	(±5,43)
		Mediana	8,05 ^a	8,34 ^a	13,90 ^b
		(Mínimo - máximo)	(0,00-22,80)	(1,23-48,90)	(6,11-26,60)
	Apoptose e/ou necrose	Média	18,32	20,37	20,35
		Desvio padrão	(±10,67)	(±22,91)	(±14,38)
		Mediana	16,40 ^a	12,60 ^a	15,45 ^a
		(Mínimo - máximo)	(0,10-40,10)	(0,28-90,00)	(2,15-48,50)
	Viabilidade	Média	36,70	45,27	49,57
		Desvio padrão	(±19,18)	(±20,98)	(18,96)
		Mediana	33,05 ^a	45,25 ^b	53,35 ^b
		(Mínimo - máximo)	(4,98-76,60)	(1,04-83,10)	(20,60-80,00)
Total de amostras de leite			36	40	24

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CH138+/Células totais: valores da expressão de CH138 em relação as células totais do leite

CH138+/Leucócitos: valores da expressão de CH138 em relação a população de leucócitos lácteos

No gráfico 12 estão representadas as medianas dos leucócitos CH138+ das amostras de leite que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis.

Gráfico 12 – Valores das medianas dos leucócitos CH138+ das amostras de leite que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis – São Paulo – 2011

Nas amostras de sangue, não foram observadas diferenças na quantidade de células polimorfonucleares, na quantidade de leucócitos CH138+ e de células polimorfonucleares CH138+ entre os grupos ($p>0,05$). Na morte celular, não foram encontradas diferenças na quantidade de células polimorfonucleares CH138+ que sofreram apoptose entre os grupos ($p>0,05$), mas as vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de células polimorfonucleares que sofreram necrose e que sofreram apoptose e/ou necrose do que as vacas do grupo negativo ($p>0,05$). Não foram observadas diferenças entre as vacas dos grupos negativo e AL e entre as vacas dos grupos AL e LP ($p>0,05$). Quanto à viabilidade, as células polimorfonucleares CH138+ das vacas do grupo LP apresentaram maior viabilidade do que as vacas do grupo negativo ($p>0,05$), estas diferenças não foram encontradas entre as vacas do grupo negativo e AL e entre as vacas do grupo AL e LP ($p>0,05$).

A figura 19 ilustra exemplos da identificação de células polimorfonucleares CH138+ do sangue de vacas dos grupos negativo, AL e LP que sofreram morte celular.

Figura 19 – Exemplos de identificação de células polimorfonucleares CH138+ do sangue de vacas que sofreram morte celular por apoptose (Q1), por apoptose e/ou necrose (Q2) e por necrose (Q3) e das células viáveis (Q4), dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite, não foram encontradas diferenças na quantidade de leucócitos entre os grupos ($p > 0,05$). As vacas do grupo AL apresentaram maior quantidade de células totais CH138+ do que as vacas dos grupos negativo e LP ($p < 0,05$), diferenças que não existiram entre as vacas dos grupos negativo e LP ($p > 0,05$). Na morte celular, as vacas dos grupos AL e LP apresentaram menor quantidade de leucócitos CH138+ que sofreram morte por apoptose do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas do grupo AL e LP ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de leucócitos CH138+ que sofreram morte por necrose do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas do grupo negativo e AL e entre as vacas do grupo AL e LP ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças na quantidade de leucócitos CH138+ que sofreram morte por apoptose e/ou necrose entre os grupos ($p > 0,05$). Quanto à viabilidade, as vacas dos grupos AL e LP apresentaram maior quantidade de leucócitos CH138+ viáveis do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$). Estas diferenças não foram observadas entre as vacas dos grupos ($p > 0,05$).

A figura 20 demonstra exemplos da identificação de leucócitos CH138+ do leite de vacas dos grupos negativo, AL e LP que sofreram morte celular.

Figura 20 – Exemplos de identificação de leucócitos (CH138+) do leite de vacas que sofreram morte celular por apoptose (Q1), por apoptose e/ou necrose (Q2) e por necrose (Q3) e das células viáveis (Q4), dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.3 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS LINFÓCITOS DO SANGUE E DO LEITE

Serão apresentados os resultados das quantificações dos linfócitos T (CD3+) e linfócitos B (CD21+) do sangue e do leite e o resultado da morte celular dos linfócitos B (CD21+) do leite.

5.3.1 Populações de linfócitos T (CD3+) do sangue e do leite

Na tabela 18 estão expressos os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativos dos linfócitos T (CD3+), dos linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) e dos linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) das amostras de sangue e de leite.

Tabela 18 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas, do mínimo e máximo dos linfócitos T (CD3+), linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) e dos linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) das amostras de sangue e de leite, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2011

			Grupos		
			N	AL	LP
Sangue	Mononucleares	Média	50,03 ^a	49,05 ^a	73,23 ^b
		Desvio padrão	(±2,61)	(±6,59)	(±6,72)
		Mediana	50,00	47,90	75,30
		(Mínimo - máximo)	(46,40-54,40)	(41,10-58,80)	(62,70-81,20)
	Leucócitos	Média	16,33 ^a	14,03 ^{ab}	11,69 ^b
		Desvio padrão	(±3,61)	(±3,39)	(±2,85)
		Mediana	16,40	12,30	11,70
		(Mínimo - máximo)	(10,20-23,40)	(10,70-19,60)	(7,84-15,70)
	Mononucleares	Média	32,74 ^a	28,90 ^a	16,12 ^b
		Desvio padrão	(±7,18)	(±7,67)	(±4,81)
		Mediana	33,80	26,55	15,40
		(Mínimo - máximo)	(19,90-44,90)	(20,70-46,50)	(11,50-25,00)
	CD8+	Média	39,83	37,16	50,15
		Desvio padrão	(±11,29)	(±12,79)	(±6,08)
		Mediana	42,20 ^a	38,50 ^a	49,50 ^b
		(Mínimo - máximo)	(23,70-59,60)	(5,83-55,30)	(43,40-58,80)
	CD4+	Média	29,62 ^a	31,61 ^a	19,90 ^a
		Desvio padrão	(±15,25)	(±7,32)	(±6,19)
		Mediana	26,90	31,25	18,10
		(Mínimo - máximo)	(10,40-56,30)	(22,10-44,70)	(13,40-29,70)
Total de amostras de sangue			09	10	06
			N	Grupos	LP
				AL	
Leite	Leucócitos	Média	87,37	83,21	87,05
		Desvio padrão	(±7,33)	(±5,65)	(±6,29)
		Mediana	88,20 ^a	81,85 ^b	86,10 ^a
		(Mínimo - máximo)	(61,40-98,50)	(73,20-97,00)	(77,40-99,00)
	Células totais	Média	6,23	12,83	11,15
		Desvio padrão	(±3,78)	(±8,74)	(±6,86)
		Mediana	5,42 ^a	9,39 ^b	10,30 ^b
		(Mínimo - máximo)	(0,49-17,80)	(2,55-33,50)	(1,85 - 24,60)
	Leucócitos	Média	7,29	15,58	12,69
		Desvio padrão	(±4,74)	(±10,77)	(±7,55)
		Mediana	6,22 ^a	11,65 ^b	12,50 ^b
		(Mínimo - máximo)	(0,52-24,00)	(3,40-42,40)	(2,14-26,40)
	CD8+	Média	48,19	41,94	39,50
		Desvio padrão	(±14,80)	(±16,72)	(±17,20)
		Mediana	47,40 ^a	41,50 ^{ab}	35,30 ^b
		(Mínimo - máximo)	(16,30-73,90)	(5,61-79,60)	(11,70-68,10)
	CD4+	Média	19,00	21,23	23,77
		Desvio padrão	(±13,13)	(±12,06)	(±12,80)
		Mediana	15,65 ^a	17,15 ^a	24,25 ^a
		(Mínimo - máximo)	(3,54-54,00)	(1,92-42,80)	(2,36-44,70)
Total de amostras de leite			36	40	24

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CD3+/Leucócitos: valores da expressão de CD3 em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CD3+/Mononucleares: expressão de CD3 em relação a população de células mononucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulosidade (FSC x SSC)

CD3+/CD8+: Linfócitos selecionados a partir do *gate* de CD3+ do sangue

CD3+/CD4+: Linfócitos selecionados a partir do *gate* de CD3+ do sangue

CD3+/Células totais: valores da expressão de CD3 em relação as células totais do leite

CD3+/Leucócitos: valores da expressão de CD3 em relação a população de leucócitos lácteos

CD3+/CD8+: Linfócitos selecionados a partir do *gate* de CD3+ do leite

CD3+/CD4+: Linfócitos selecionados a partir do *gate* de CD3+ do leite

No gráfico 13 estão representadas as médias dos linfócitos T (CD3+), dos linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) e dos linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) das amostras de sangue e no Gráfico 14 estão representadas as medianas das amostras de leite.

Gráfico 13 – Valores médios dos linfócitos T (CD3+), dos linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) e dos linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) das amostras de sangue – São Paulo – 2011

Gráfico 14 – Valores das medianas dos linfócitos T (CD3+), dos linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) e dos linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) das amostras de leite – São Paulo – 2011

Nas amostras de sangue, as vacas do grupo LP apresentaram maiores quantidades de células mononucleares do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de linfócitos T (CD3+) do que as amostras de sangue das vacas do grupo AL ($p < 0,05$), estas diferenças não foram encontradas entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$). Menores quantidades de linfócitos T (CD3+) também foram observadas em vacas do grupo LP quando comparados com vacas dos grupos negativos e AL ($p < 0,05$), diferenças que não foram encontradas entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de linfócitos T citotóxico (CD3+ CD8+) do que as vacas dos grupos negativos e AL ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças entre as vacas dos grupos negativos e AL ($p > 0,05$). Também não foram encontradas diferenças na quantidade de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) ($p > 0,05$). Não foram encontradas diferenças na relação de CD4+:CD8+ entre os grupos ($p > 0,05$).

A figura 21 retrata exemplos da identificação de linfócitos T (CD3+), dos linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) e dos linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) nas células mononucleares do sangue das vacas dos grupos negativo, AL e LP.

Figura 21 – Exemplos de identificação de linfócitos T (CD3+), linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) (Q1) e de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) (Q3) nas células mononucleares do sangue das vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite, as vacas do grupo AL apresentaram menor quantidade de leucócitos do que as vacas dos grupos negativo e LP ($p < 0,05$), diferenças que não foram encontradas entre as vacas dos grupos negativo e LP ($p > 0,05$). As vacas dos grupos AL e LP apresentaram maior quantidade de células totais CD3+ e de leucócitos CD3+ do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas dos grupos AL e LP ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de linfócitos T citotóxico (CD3+ CD8+) do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre as vacas dos grupos AL e negativo e entre as vacas dos grupos AL e LP ($p > 0,05$). Quanto à quantidade de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) não foram encontradas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). Foi observada diferença na relação entre CD4+:CD8+ entre as vacas dos grupos negativo e LP ($p < 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maior relação CD4+:CD8+.

A figura 22 retrata exemplos da identificação de linfócitos T (CD3+), dos linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) e dos linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) nos leucócitos do leite das vacas dos grupos negativo, AL e LP.

Figura 22 – Exemplos de identificação da população de leucócitos, de linfócitos T (CD3+), linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) (Q1) e de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) (Q3) nos leucócitos do leite das vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.3.2 Populações de linfócitos B (CD21+) do sangue e do leite

Nas tabelas 19 e 20 estão representados os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativos dos linfócitos B (CD21+), dos linfócitos B (CD21+ CD5+) e da subunidade da β_2 -integrina (CD21+ CD11b+) das amostras de sangue e de leite, respectivamente.

Tabela 19 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e do mínimo e máximo dos linfócitos B (CD21+), linfócitos B (CD21+ CD5+) e da subunidade da β_2 – integrina (CD21+ CD11b+) das amostras de sangue, em relação aos grupos experimentais – São Paulo – 2011

			Grupos			
			N	AL	LP	
Sangue	Mononucleares	Média	49,67 ^a	46,84 ^a	65,05 ^b	
		Desvio padrão	(±4,90)	(±5,46)	(±8,57)	
		Mediana	49,50	45,70	64,95	
		(Mínimo - máximo)	(43,10-59,80)	(39,20-57,30)	(55,10-74,40)	
	Leucócitos	Média	20,73 ^a	24,32 ^a	48,12 ^b	
		Desvio padrão	(±4,18)	(±4,83)	(±12,35)	
		Mediana	21,00	24,95	49,15	
		(Mínimo - máximo)	(15,10-29,10)	(16,60-30,30)	(33,20-61,30)	
	Mononucleares	Média	41,86 ^a	51,85 ^b	73,03 ^c	
		Desvio padrão	(±8,15)	(±8,38)	(±10,03)	
		Mediana	42,50	52,85	73,55	
		(Mínimo - máximo)	(30,50-56,50)	(40,30-62,50)	(60,40-86,10)	
	CD5+	Média	9,51	4,83	5,47	
		Desvio padrão	(±4,22)	(±3,52)	(±1,94)	
		Mediana	9,13 ^a	3,63 ^b	5,13 ^{ab}	
		(Mínimo - máximo)	(3,33-15,80)	(1,50-12,10)	(2,77-8,64)	
	CD21+	CD11b+	Média	22,56	20,09	4,50
			Desvio padrão	(±5,18)	(±21,97)	(±2,33)
			Mediana	23,80 ^a	12,65 ^b	4,87 ^c
			(Mínimo - máximo)	(13,90-27,40)	(4,55-81,20)	(1,47-7,81)
	CD5+/CD11b+	Média	57,30	66,09	86,95	
		Desvio padrão	(±11,42)	(±20,06)	(±5,21)	
		Mediana	52,90 ^a	68,95 ^a	88,30 ^b	
		(Mínimo - máximo)	(44,70-78,40)	(12,90-85,40)	(79,30-92,50)	
CD5-/CD11b-	Média	10,64 ^a	8,98 ^a	3,08 ^b		
	Desvio padrão	(±4,43)	(±5,36)	(±2,36)		
	Mediana	10,70	7,63	2,19		
	(Mínimo - máximo)	(2,99-17,60)	(2,15-20,30)	(1,28-7,70)		
Intensidade de expressão de CD11b+	Média	68,1	122,1	105,7		
	Desvio padrão	(±40,0)	(±53,6)	(±58,2)		
	Mediana	63,5 ^a	114,5 ^a	89,0 ^a		
	(Mínimo - máximo)	(17,2-124,0)	(32,6-190,0)	(50,0-214,0)		
Total de amostras de sangue			09	10	06	

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CD21+/Leucócitos: valores da expressão de CD21 em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CD21+/Mononucleares: expressão de CD21 em relação a população de células mononucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulocidade (FSC x SSC)

CD21+/CD5+: Linfócitos selecionados a partir do *gate* de CD21+ do sangue

CD21+/CD11b+: Linfócitos selecionados a partir do *gate* de CD21+ do sangue

CD21+/CD5+/CD11b+: Linfócitos selecionados a partir do *gate* de CD21+ do sangue

CD21+/CD5-/CD11b-: Linfócitos selecionados a partir do *gate* de CD21+ do sangue

No gráfico 15 estão representadas as medianas dos linfócitos B (CD21+), dos linfócitos B citotóxicos (CD21+ CD5+), da subunidade da β_2 – integrina (CD21+ CD11b+) dos linfócitos B (CD21+ CD5- CD11b+) e dos linfócitos B (CD21+ CD5- CD11b-) das amostras de sangue.

Gráfico 15 – Valores das medianas dos linfócitos B (CD21+), dos linfócitos B (CD21+ CD5+), da subunidade da β_2 -integrina (CD21+ CD11b+), dos linfócitos B (CD21+ CD5+ CD11b+) e dos linfócitos B (CD21+ CD5- CD11b-) das amostras de sangue – São Paulo – 2011

Tabela 20 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e do mínimo e máximo dos linfócitos B (CD21+), linfócitos B (CD21+ CD5+) e da subunidade da β_2 – integrina (CD21+ CD11b) das amostras de leite, em relação aos grupos de LEB – São Paulo – 2011

			Grupos			
			N	AL	LP	
Leite	Leucócitos	Média	87,45	82,53	86,84	
		Desvio padrão	(±7,52)	(±5,70)	(±6,40)	
		Mediana	88,40 ^a	81,25 ^b	85,60 ^a	
		(Mínimo - máximo)	(61,60-98,30)	(70,70-96,20)	(74,80-99,10)	
	Células totais	Média	8,36	10,33	18,41	
		Desvio padrão	(±6,31)	(±5,93)	(±20,01)	
		Mediana	6,00 ^a	8,81 ^b	15,25 ^c	
		(Mínimo - máximo)	(0,61-29,90)	(0,86-24,50)	(6,40-109,00)	
	Leucócitos	Média	9,47	12,57	16,63	
		Desvio padrão	(±6,64)	(±7,33)	(±6,61)	
		Mediana	7,39 ^a	11,00 ^b	15,50 ^c	
		(Mínimo - máximo)	(0,62-31,60)	(1,14-31,20)	(7,46-32,40)	
	CD5+	Média	8,92	9,12	6,90	
		Desvio padrão	(±9,50)	(±8,20)	(±5,25)	
		Mediana	4,13 ^a	6,11 ^a	6,16 ^a	
		(Mínimo - máximo)	(0,23-31,40)	(0,04-27,50)	(0,46-15,70)	
	CD21+	CD11b+	Média	53,04	51,01	45,32
			Desvio padrão	(±17,74)	(±22,26)	(±13,56)
			Mediana	56,45 ^a	47,30 ^{ab}	44,95 ^b
			(Mínimo - máximo)	(12,80-81,30)	(12,80-92,90)	(27,60-84,90)
	CD5+/CD11b+	Média	11,65	8,05	6,68	
		Desvio padrão	(±9,32)	(±5,66)	(±4,59)	
		Mediana	9,17 ^a	7,05 ^{ab}	4,71 ^b	
		(Mínimo - máximo)	(1,95-39,90)	(0,58-34,80)	(1,47-16,20)	
	CD5+/CD11b-	Média	26,39	31,82	41,09	
		Desvio padrão	(±11,82)	(±19,25)	(±15,53)	
		Mediana	24,80 ^a	27,35 ^a	40,40 ^b	
		(Mínimo - máximo)	(6,08-52,40)	(4,01-78,40)	(10,10-64,10)	
	Intensidade de expressão de CD11b+	Média	181,50	403,20	120,10	
		Desvio padrão	(±153,50)	(±482,70)	(±132,10)	
		Mediana	142,50 ^a	258,50 ^b	82,30 ^a	
		(Mínimo - máximo)	(13,1-616,00)	(25,3-2567,00)	(10,1-640,00)	
Total de amostras de leite			36	40	24	

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CD21+/Células totais: valores da expressão de CD21 em relação as células totais do leite

CD21+/Leucócitos: valores da expressão de CD21 em relação a população de leucócitos lácteos

CD21+/CD5+: Linfócitos selecionados a partir do *gate* de CD21+ do leite

CD21+/CD11b+: Linfócitos selecionados a partir do *gate* de CD21+ do leite

CD21+/CD5+/CD11b+: Linfócitos selecionados a partir do *gate* de CD21+ do leite

CD21+/CD5-/CD11b-: Linfócitos selecionados a partir do *gate* de CD21+ do leite

No gráfico 16 estão representadas as medianas dos linfócitos B (CD21+), dos linfócitos B citotóxicos (CD21+ CD5+), subunidade da β_2 – integrina (CD21+ CD11b+), dos linfócitos B (CD21+ CD5+ CD11b+) e dos linfócitos B (CD21+ CD5- CD11b-) das amostras de leite.

Gráfico 16 – Valores das medianas dos linfócitos B (CD21+), dos linfócitos B (CD21+ CD5+), subunidade da β_2 – integrina (CD21+ CD11b+), dos linfócitos B (CD21+ CD5+ CD11b+) e dos linfócitos B (CD21+ CD5- CD11b-) das amostras de leite – São Paulo – 2011

Nas amostras de sangue, as vacas do grupo LP apresentaram maiores quantidades de células mononucleares e de leucócitos CD21+ do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$), diferenças que não foram encontradas entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maiores quantidades de linfócitos B (CD21+) do que as vacas dos grupos negativos e AL, que apresentaram maiores quantidades de linfócitos B (CD21+) do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$). As vacas do grupo AL apresentaram menores quantidades de linfócitos B (CD21+ CD5+) do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$). Esta diferença não foi constatada entre as vacas do grupo LP e AL ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de linfócitos B (CD21+ CD11b+) do que as vacas dos grupos negativo e AL e estas vacas apresentaram menor quantidade do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de linfócitos B (CD21+ CD5+ CD11b+) do que as vacas dos grupos negativos e AL ($p < 0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de linfócitos B que não expressaram o CD5+ e nem o CD11b+ (CD21+ CD5- CD11b-) quando comparadas às vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$), diferenças que não foram encontradas entre as vacas do grupo negativo e AL ($p > 0,05$). Quanto a intensidade de

expressão do linfócito B (CD21+ CD11b+) não foram observadas diferenças entre os grupos ($p>0,05$).

A figura 23 ilustra exemplos da identificação de linfócitos B (CD21+), dos linfócitos B (CD21+ CD5+) e dos linfócitos B (CD21+ CD11b+) nas células mononucleares do sangue das vacas dos grupos negativo, AL e LP.

Figura 23 – Exemplos de identificação de linfócitos B (CD21+), linfócitos B (CD21+ CD5+) (Q1), de linfócitos B (CD21+ CD5+ CD11b+) (Q2) e de linfócitos B (CD21+ CD11b+) (Q3) e dos linfócitos B (CD21+ CD5- CD11b-) (Q4) do sangue das vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite foram verificados que as vacas do grupo AL apresentaram menor quantidade de leucócitos do que as vacas dos grupos negativo e LP ($p<0,05$), diferenças que não foram encontradas entre as vacas dos grupos negativo e LP ($p>0,05$). As vacas dos grupos AL e LP apresentaram maior quantidade de células totais CD21+ e de leucócitos (CD21+) do que as vacas do grupo negativo ($p<0,05$) e as vacas do grupo AL apresentaram menor quantidade do que as vacas do grupo LP ($p<0,05$). Não foram encontradas diferenças na quantidade de linfócitos B (CD21+ CD5+) entre os grupos ($p>0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de linfócitos (CD21+

CD11b+) do que as vacas do grupo negativo, diferenças que não foram encontradas entre as vacas dos grupos negativo e AL e entre os grupos AL e LP ($p>0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de linfócitos B (CD5+ CD11b+) do que as vacas do grupo negativo ($p<0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas dos grupos negativo e AL, e entre os grupos AL e LP ($p>0,05$). As vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de linfócitos B (CD21+ CD5- CD11b-) do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p<0,05$), neste caso, a quantidade de células nas vacas do grupo negativo foi semelhante ao grupo AL ($p>0,05$). Quanto a intensidade de expressão do (CD21+ CD11b+), foi observado que as vacas do grupo AL apresentaram maior intensidade do que as vacas dos grupos negativo e LP ($p<0,05$). Diferenças que não foram encontradas entre as vacas negativas e as vacas LP ($p>0,05$).

A figura 24 demonstra exemplos da identificação de linfócitos B (CD21+), dos linfócitos B (CD21+ CD5+) e dos linfócitos B (CD21+ CD11b+) do leite das vacas dos grupos negativo, AL e LP.

Figura 24 – Exemplos de identificação da população de leucócitos, de linfócitos B (CD21+), linfócitos B (CD21+ CD5+) (Q1), linfócitos B (CD21+ CD5+ CD11b) (Q2), linfócitos B (CD21+ CD11b+) (Q3), e de linfócitos B (CD21+ CD5- CD11b-) (Q4) nos leucócitos do leite das vacas dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.3.3 Morte celular dos linfócitos B (CD21+) do sangue e do leite

Nas tabelas 21 e 22 estão representados os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo da morte celular dos linfócitos B (CD21+) das amostras do sangue e de leite, respectivamente.

Tabela 21 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo da morte celular dos linfócitos B (CD21+) das amostras do sangue nos grupos experimentais – São Paulo – 2011

			N	Grupos AL	LP
Sangue	Mononucleares	Média	61,92 ^a	64,22 ^a	81,20 ^b
		Desvio padrão	(±10,54)	(±9,59)	(±5,74)
		Mediana	57,80	63,35	80,45
		(Mínimo - máximo)	(52,60-87,80)	(49,00-76,50)	(75,00-88,70)
	Leucócitos	Média	13,63 ^a	16,25 ^a	40,63 ^b
		Desvio padrão	(±3,80)	(6,14±)	(10,98±)
		Mediana	13,90	15,90	41,25
		(Mínimo - máximo)	(5,66-17,90)	(8,12-26,70)	(26,10-52,80)
	Mononucleares	Média	22,47 ^a	24,84 ^a	50,00 ^b
		Desvio padrão	(6,89±)	(7,08±)	(13,40±)
		Mediana	24,60	24,80	48,95
		(Mínimo - máximo)	(10,00-30,00)	(14,70-34,90)	(34,60-70,40)
	Apoptose	Média	5,30 ^a	3,88 ^a	1,56 ^b
		Desvio padrão	(±1,686)	(±1,588)	(±0,28)
		Mediana	5,02	3,49	1,59
		(Mínimo - máximo)	(3,57-8,48)	(1,98-6,14)	(1,13-1,93)
	Necrose	Média	0,41 ^a	2,32 ^a	0,05 ^b
		Desvio padrão	(±0,30)	(±3,54)	(±0,07)
		Mediana	0,35 ^a	0,20 ^a	0,03 ^b
		(Mínimo - máximo)	(0,02-0,90)	(0,01-8,80)	(0,00-0,20)
	Apoptose e/ou necrose	Média	0,06	0,75	0,00167
		Desvio padrão	(±0,06)	(±1,42)	(±0,00408)
		Mediana	0,04 ^a	0,02 ^a	0,00 ^b
		(Mínimo - máximo)	(0,00-0,22)	(0,00-4,06)	(0,00-0,01)
	Viabilidade	Média	94,22 ^a	93,05 ^a	98,38 ^b
		Desvio padrão	(±1,601)	(±4,32)	(±0,26)
		Mediana	94,60	94,15	98,40
		(Mínimo - máximo)	(91,30-96,40)	(84,15-97,90)	(98,00-98,70)
Total de amostras de sangue			09	10	06

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CD21+/Leucócitos: valores da expressão de CD21 em relação a população de leucócitos totais sanguíneos

CD21+/Mononucleares: expressão de CD21 em relação a população de células mononucleares sanguíneas selecionadas pelo tamanho e granulidade (FSC x SSC)

No gráfico 17 estão representadas as médias dos linfócitos B (CD21+) das amostras de sangue que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis.

Gráfico 17 – Valores médios dos linfócitos B (CD21+) das amostras de sangue que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis – São Paulo – 2011

Tabela 22 – Valores percentuais das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo relativo da morte celular dos linfócitos B (CD21+) do leite nos grupos experimentais – São Paulo – 2011

			N	Grupos AL	LP
Leite	Leucócitos	Média	80,80	82,46	79,28
		Desvio padrão	(±13,73)	(±8,34)	(±14,44)
		Mediana	85,85 ^a	85,10 ^a	83,00 ^a
		(Mínimo - máximo)	(47,90-98,00)	(65,30-96,20)	(56,00-99,30)
	Células totais	Média	7,53	12,29	9,12
		Desvio padrão	(±5,47)	(±8,69)	(±8,15)
		Mediana	6,02 ^a	11,00 ^b	5,76 ^{ab}
		(Mínimo - máximo)	(1,00-21,60)	(1,04-33,70)	(1,55-33,50)
	Leucócitos	Média	9,02	15,45	11,58
		Desvio padrão	(±6,05)	(±12,22)	(±10,17)
		Mediana	8,41 ^a	12,85 ^{ab}	8,22 ^{ab}
		(Mínimo - máximo)	(1,17-22,70)	(1,20-50,30)	(1,57-44,90)
	Apoptose	Média	54,51	27,80	12,46
		Desvio padrão	(±21,02)	(±23,54)	(±9,74)
		Mediana	61,45 ^a	18,35 ^b	10,23 ^c
		(Mínimo - máximo)	(6,37-88,40)	(0,14-76,60)	(1,03-42,20)
	Necrose	Média	2,08	17,43	8,70
		Desvio padrão	(±2,12)	(±18,94)	(±8,87)
		Mediana	1,39 ^a	6,17 ^b	6,59 ^b
		(Mínimo - máximo)	(0,14-9,62)	(0,00-57,40)	(0,58-40,40)
	Apoptose e/ou necrose	Média	4,88	7,98	5,19
		Desvio padrão	(±3,81)	(±9,91)	(±4,88)
		Mediana	3,92 ^a	3,46 ^a	4,30 ^a
		(Mínimo - máximo)	(0,66-16,40)	(0,05-33,10)	(0,00-17,40)
	Viabilidade	Média	38,51	46,78	110,10
		Desvio padrão	(±20,92)	(±20,16)	(±183,9)
		Mediana	34,65 ^a	43,85 ^a	75,20 ^b
		(Mínimo - máximo)	(7,50-86,70)	(17,70-89,30)	(37,2-971,0)
Total de amostras de leite			36	40	24

A presença da letra no canto superior das médias indica que as amostras apresentaram distribuição paramétrica.

A presença da letra no canto superior das medianas indica que as amostras apresentaram distribuição não paramétrica.

Letras minúsculas indicam diferenças entre as colunas ($p < 0,05$)

N: Vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB

AL: Vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente

LP: Vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

CD21+/Células totais: valores da expressão de CD21 em relação as células totais do leite

CD21+/Leucócitos: valores da expressão de CD21 em relação a população de leucócitos lácteos

No gráfico 18 estão representadas as medianas dos linfócitos B (CD21+) das amostras de leite que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis.

Gráfico 18 – Valores das medianas dos linfócitos B (CD21+) das amostras de leite que sofreram o processo de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose e das células viáveis – São Paulo – 2011

Nas amostras de sangue, as vacas dos grupos LP apresentaram maiores quantidades de células mononucleares, de leucócitos CD21+ e de linfócitos B (CD21+) do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$). Não foram detectadas diferenças entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$). Foi observado que as vacas do grupo LP apresentaram menores quantidades de linfócitos B (CD21+) que sofreram morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$). Consequentemente, foi observado que as vacas do grupo LP apresentaram maior viabilidade de linfócitos B (CD21+) do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$).

A figura 25 representa exemplos da identificação de linfócitos B (CD21+) do sangue de vacas dos grupos negativo, AL e LP que sofreram morte celular.

Figura 25 – Exemplos de identificação de linfócitos B (CD21+) do sangue de vacas que sofreram morte celular por apoptose (Q1), apoptose e/ou necrose (Q2) e por necrose (Q3) e das células viáveis (Q4) dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

Nas amostras de leite, não foram observadas diferenças na quantidade de leucócitos entre os grupos ($p > 0,05$). As vacas do grupo AL apresentaram maiores quantidades de células totais CD21+ e de linfócitos B (CD21+) do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças entre as vacas dos grupos negativo e LP e entre as vacas dos grupos AL e LP ($p > 0,05$). Na morte celular, as vacas do grupo AL e LP apresentaram menores quantidades de linfócitos B (CD21+) em processo de morte celular por apoptose do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$), resultados semelhantes foram observados na comparação de vacas do grupo AL e LP, onde as vacas do grupo AL apresentaram maior quantidade de linfócitos B (CD21+) em morte por apoptose ($p < 0,05$). As vacas dos grupos AL e LP apresentaram maiores quantidades de linfócitos B (CD21+) em morte por necrose do que as vacas do grupo negativo ($p < 0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas dos grupos AL e LP ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças entre os grupos na quantidade de linfócitos B (CD21+) que sofreram apoptose e/ou necrose ($p > 0,05$). Quanto à viabilidade, foi observado que as vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de linfócitos B (CD21+) viáveis do que as vacas dos grupos negativo e AL ($p < 0,05$), diferenças que não foram observadas entre as vacas dos grupos negativo e AL ($p > 0,05$).

A figura 26 representa exemplos da identificação de linfócitos B (CD21+) do leite de vacas dos grupos negativo, AL e LP que sofreram morte celular.

Figura 26 – Exemplos de identificação de linfócitos B (CD21+) do leite de vacas que sofreram morte celular por apoptose (Q1), apoptose e/ou necrose (Q2) e por necrose (Q3) e das células viáveis (Q4), dos grupos negativo (a), AL (b) e LP (c) – São Paulo – 2011

5.4 ANÁLISE DE CORRELAÇÕES

Em relação a CCS automática e a quantidade de linfócitos T (CD3+), foi observado uma correlação positiva e fraca ($r=0,20$) ($p<0,05$) e uma correlação positiva e média da CCS com a quantidade de leucócitos CH138+ ($r=0,43$) ($p<0,05$). Já com os macrófagos CD14+, foi observada uma correlação negativa e fraca ($r=-0,37$) ($p<0,05$). Não foram observadas correlação da CCS com a quantidade de linfócitos B (CD21+) ($p>0,05$), segundo Calligari-Jacques (2003).

Conforme já relatado no material e métodos, o exame bacteriológico foi classificado por escore. Foi observada uma correlação positiva e média ($r=0,59$) entre o exame bacteriológico e a CCS ($p<0,05$). Em relação à quantificação dos leucócitos na citometria de fluxo, foi observada uma correlação positiva fraca ($r=0,31$) entre o exame bacteriológico e a quantidade de linfócitos T (CD3+) ($p<0,05$). Entre o exame bacteriológico e a quantidade de leucócitos CH138+ foi observada uma correlação positiva e média ($r=0,40$) ($p<0,05$). Entre o exame bacteriológico e a quantidade de macrófagos CD14+ foi observada uma correlação negativa e fraca ($r=-0,377$) ($p<0,05$). Não foram observadas correlação do exame bacteriológico com a quantidade de linfócitos B CD21+ ($p>0,05$).

6 DISCUSSÃO

Para investigar a possível interferência que a LEB possa causar aos principais e mais precoces sistemas imunitários da glândula mamária de animais naturalmente infectados, o presente estudo buscou homogeneizar os grupos para não tendenciar variações causadas pela mamite propriamente dita. Para tal, duas propriedades produtoras de leite localizadas no Estado de São Paulo foram disponibilizadas, 194 vacas foram submetidas a um relativamente longo período de triagem (aproximadamente quatro meses) e 25 animais foram selecionados para respectiva avaliação funcional dos fagócitos e suas interações.

Considerou-se negativas para a LEB as vacas soronegativas no ELISA e positivas para a LEB as sororreagentes na IDGA (NAIF et al., 1990; WERLING et al., 1995; GONZÁLEZ et al., 1999; SIMARD et al., 2000; DE GIUSEPPE et al., 2004). Essa estratégia não traz novidades (MATOS; BIRGEL JUNIOR; BIRGEL, 2005), mas difere de alguns estudos nacionais onde o diagnóstico para a LEB procedeu-se exclusivamente pela IDGA (ROMERO; CRUZ; ROWE, 1983; CARNEIRO et al., 2009). O emprego tanto da IDGA quanto do ELISA já tem sido associado por essa equipe em estudos anteriores (AZEDO, 2010; SOUZA, 2010) visando evitar resultados falso-negativos (AZEDO, 2010).

Atendidos os critérios de inclusão amostral (mesma propriedade, ausência de tratamento, diagnóstico da LEB e perfil hematológico), foi possível selecionar nove vacas do grupo negativo, dez do grupo AL e seis do grupo LP. Foi interessante observar que as vacas do grupo LP apresentaram maior debilidade e morte que as vacas negativas e AL, fato que dificultou a composição do grupo LP, por serem mais frequentemente descartadas por doenças intercorrentes. Esta observação pode ter sido circunstancial, mas também foi valorizada por Pollari et al. (1992) e destacada por Nagy et al. (2002) que além disso, consideraram ser essa manifestação da doença, importante fonte de infecção para o rebanho. Apesar de não ter sido o objetivo desse estudo referir se os animais com linfocitose persistente seriam mais passíveis de descarte em uma propriedade comercial, as perdas econômicas relacionadas a LEB foram anteriormente descritas por Brenner et al. (1989), Jacobs et al. (1991), Ott, Johnson e Wells (2003), Sandev et al. (2004) e Tiwari et al., (2007).

Iniciando a investigação, da higidez da glândula mamária, foram realizadas as primeiras avaliações que objetivaram empregar as provas triviais para diagnóstico de mamite. Executou-se prova de fundo escuro, CMT, CCS automática e exame bacteriológico. Como já referido, as amostras de leite positivas no exame bacteriológico não foram excluídas

para não tendenciar as análises, uma vez que se optasse pela inclusão somente de vacas negativas ao exame bacteriológico, poderiam estar sendo selecionadas vacas mais resistentes e as vacas positivas não permitiriam compor subgrupos estratificados pelo exame bacteriológico. Uma outra alternativa, teria sido a composição dos grupos empregando novilhas virgens, modelo usado pela equipe de Sladek na República Checa em estudos similares (SLADEK et al., 1999; SLADEK; RYZNAROVA; RYSANEK, 2006), e que talvez suprimisse a necessidade de remover outras interferências, mas poderia dificultar ainda mais a composição do grupo LP por ser a LEB uma doença de evolução crônica e, especificamente essa manifestação, mais tardia, além de não representar as interferências em uma lactação propriamente dita.

Considerando apenas o CMT, 29 amostras foram diagnosticadas como formas inaparentes de mamites também chamadas de subclínicas (BROLUND, 1985; SANDEV et al., 2004) ou catarrais incipientes (GARCIA et al., 1996), quatro amostras apresentavam alterações macroscópicas do leite ao exame do fundo escuro também consideradas como mamite catarral ou clínica, 53 amostras apresentavam-se com celularidade superior a 100.000 células/mL e 24 amostras apresentavam-se positivas no exame bacteriológico.

Mediante o observado, não foi possível determinar em qual manifestação da LEB as alterações inflamatórias e/ou infecciosas da glândula mamária foram mais comuns. Estudos anteriores não apresentaram consenso quanto a essa hipótese. Alguns autores afirmaram que os animais positivos para a LEB foram os mais susceptíveis (D'ANGELINO; GARCIA; BIRGEL, 1998; SANDEV et al., 2004) enquanto outros descartaram essa possibilidade (FETROW; FERRER, 1982), discordâncias essas que inclusive contribuíram na motivação desse estudo.

6.1 AVALIAÇÃO DOS FAGÓCITOS SANGUÍNEOS E LÁCTEOS

É sabido que o sistema imune rege uma complexa interdependência de ações que apesar de coletiva e coordenada, deve ser precedida por mecanismos efetores caracterizados pela resposta inata (ABBAS et al., 2008). O presente estudo buscou avaliar inicialmente a função dos fagócitos lácteos não só por serem estas células as representantes do principal sistema de defesa mamário (RAINARD; RIOLLET, 2006) como também por ser

uma resposta precoce que antecede outras vias imunológicas (BURTON; ERSKINE, 2003). As amostras de leite e de sangue foram colhidas e processadas no mesmo dia. Por avaliar a viabilidade celular e a atividade funcional das células, o armazenamento ou o congelamento destas amostras não foi possível, o que resultou em longo período de processamento. Somando-se a distância da fazenda, o processamento e as análises das amostras no laboratório, duravam 24 horas ininterruptas.

6.1.1 Avaliação das populações de fagócitos mononucleares sanguíneos e lácteos

A imunofenotipagem aumenta a especificidade da descrição do perfil celular porque permite a identificação de moléculas da superfície das células, chamadas grupamento de diferenciação ou, mais comumente, *cluster of differentiation* (CD). Por se tratar de um estudo de fagócitos, dois marcadores protagonizaram a investigação: CD14 e CH138. Procedeu-se também as marcações para linfócitos B (CD21+) e T (CD3+) que serão posteriormente discutidas.

O CD14 é um receptor celular e está envolvido em uma série de respostas biológicas e imunológicas e quando expresso nos leucócitos funciona como molécula chave no reconhecimento de patógenos invasores e no desencadeamento da cascata de reações inflamatórias (LEE et al., 2003). Este receptor é expresso pelas células polimorfonucleares (PAAPE et al., 1996; SLADEK; RYZNAROVA; RYSANEK, 2006), mas principalmente pelos monócitos-macrófagos (PAAPE et al., 1996; RIOLETT et al., 2001; SLADEK; RYZNAROVA; RYSANEK, 2006; KOESS; HAMANN, 2008; PIEPERS et al., 2009; SLADEK; RYSANEK, 2011). Embora alguns autores relatem a importância da expressão do CD14 pelos neutrófilos (BURTON; ERSKINE, 2003; LEE et al., 2003; SLADEK; RYSANEK, 2006), Piepers et al. (2009) observaram que apenas 3% das células positivas para CD14+ foram encontradas no *gate* de células polimorfonucleares. Burton e Erskine (2003) enfatizam que a maioria dos neutrófilos bovinos não expressam CD14 na superfície mas possuem estas moléculas armazenadas nos grânulos citoplasmáticos, prontos para agirem. Quando os neutrófilos sanguíneos migram, os grânulos que contêm CD14 seguem para a superfície das células onde estas moléculas podem interagir com os componentes da parede bacteriana. Esta teoria citada por Burton e Erskine (2003) pôde ser confirmada recentemente por Sladek e Rysanek (2011). Estes autores afirmam que quando as células

polimorfonucleares do sangue e os polimorfonucleares residentes e inflamatórios da glândula mamária de novilhas aumentavam a expressão de CD14, esta foi acompanhada de aumento da apoptose e necrose.

Até onde se tem registro, esse trabalho é pioneiro no emprego da citometria de fluxo em estudos imunológicos de leite bovino no Brasil, apesar de existirem registros sobre tal há mais de trinta anos (HAGELTORN; SAAD, 1986). Existem relatos e indicações de outra citometria fluxométrica empregada exclusivamente para a CCS automática do leite, realizadas em larga escala, que objetivam exclusivamente quantificar as células presentes no leite, quer para diagnóstico, quer para avaliação da qualidade do leite (SOUZA et al., 2009), análise que também foi realizada neste estudo. Esse hiato é compreensível porque a disponibilização desses equipamentos é onerosa e a viabilização de equipes treinadas para tal é lenta e embora a técnica apresente muitas indicações e seja considerada padrão ouro (ÖSTENSSON et al., 1988; PILLAI et al., 2001; RIVAS et al., 2001; DOSOGNE et al., 2003) para algumas análises (GERSTNER et al., 2006) não apresenta a simplicidade referida por alguns grupos (KOESS; HAMANN, 2008; RIVAS et al., 2001) até mesmo, porque aspectos muito básicos já consagrados para avaliação de células sanguíneas, como o posicionamento das principais células no gráfico (tamanho x granulosidade), ainda não está padronizado, como no caso dos monócitos/macrófagos (KOESS; HAMANN, 2008).

Durante a análise do leite, a mesma dificuldade relatada por alguns autores para a localização das células, foi observada nesse estudo na identificação dos macrófagos e das células que expressaram CD14 (DOSOGNE et al., 2003; KOESS; HAMANN, 2008), provavelmente pela diversidade morfológica dos macrófagos, dependente do seu grau de ativação (PAAPE et al., 1981; SLADEK; RYZNAROVA; RYSANEK, 2006). Em estudo dessa mesma equipe, que culminou com o trabalho de doutorado de Azedo (AZEDO, 2010), optou-se por considerar os resultados como leucócitos positivos para o marcador em questão (leucócitos CD14+, leucócitos CH138+, etc.) mas no presente estudo adotou-se o proposto por Rysanek et al., (2006) e Sladek e Rysanek, (2010) onde identificou-se previamente a população de macrófagos pelo tamanho e granulosidade e nestes identificou-se as células marcadas com anticorpos monoclonais CD14+. Essas informações devem ser claras para garantir a repetibilidade dos estudos e tornar a padronização da análise dessas células dos bovinos, cada vez mais próxima de um consenso.

No presente estudo, observou-se que as amostras de leite de vacas positivas para a LEB, independentes das alterações hematológicas, apresentaram maior quantidade de macrófagos do que as vacas do grupo negativo. Dentro desta população foram identificadas as

células CD14⁺ que foram classificadas como macrófagos CD14⁺. Não foram observadas diferenças na quantidade destas entre os grupos. Deve-se lembrar que no leite de bovinos provenientes de mamas sadias é possível encontrar o chamado CD14 solúvel (sCD14). A quantidade de sCD14 é maior durante o início e o final da lactação. Este aumento do sCD14 é explicado por Lee et al. (2003) como resultado do aumento de neutrófilos durante estes períodos. Estes autores não observaram o aumento do sCD14 em processos infecciosos. O sCD14 é resultante da liberação do CD14 da membrana das células polimorfonucleares (SOHN et al., 2007). Para Vangroenweghe et al. (2004) a ativação da resposta imune inata pode ocorrer com níveis basais de sCD14 e proteína de ligação de LPS (*LPS-binding*). Estes autores acreditam que o sCD14 é removido da suspensão celular durante a centrifugação do leite. Desta maneira, pode-se dizer que os resultados do presente estudo com CD14 não tiveram interferências com o sCD14. Apesar de não ter sido encontradas diferenças entre os grupos, não pode-se descartar as alterações funcionais destas células. Visto que nestas amostras estão contidas células residentes e inflamatórias (LEITNER et al., 2000; PILLAI et al., 2001; RIVAS et al., 2001; SODILLO; STREICHER, 2002; RAINARD; RIOLLET, 2006; KOESS; HAMANN, 2008; BANNERMAN, 2004; BAUMERT et al., 2009; SLADEK; RYSANEK, 2010) entre os quais ainda poderiam existir subgrupos funcionalmente distintos.

Já nas amostras de sangue, inicialmente foram identificadas as células mononucleares pelo tamanho e granulosidade, estabelecidos em *gate*. A partir destas, foram identificadas as que expressaram CD14, as quais foram chamadas de células mononucleares CD14⁺. As vacas positivas para a LEB apresentaram menor quantidade de células mononucleares CD14⁺ do que as vacas do grupo negativo. No estudo realizado pela equipe de Werling no Reino Unido com LEB, resultados semelhantes foram encontrados. Ao investigarem o efeito da infecção pelo VLEB na função fagocítica de monócitos avaliados imediatamente após a colheita e após o cultivo por sete dias, observaram similaridade na expressão de CD14 nas amostras imediatamente processadas e uma diminuição da expressão de CD14 pelos monócitos após o cultivo de sete dias. Azedo (2010) apesar de ter estratificado os grupos da LEB quanto a influência da vacina para a Febre Aftosa e de não ter realizado um *gate* para a separação das células mononucleares, encontrou diferenças na quantidade de células CD14⁺. Para ele, esta diferença foi decorrente da constante exposição aos patógenos que estes animais estavam sendo submetidos ou seja, há variações individuais dependentes da diversidade de exposição à outros patógenos além do VLEB.

Esta diferença encontrada no sangue foi compreensível, pois os animais positivos para a LEB, principalmente as vacas do grupo LP, apresentam maior quantidade de

células mononucleares. Este aumento foi decorrente da maior quantidade de linfócitos B que os animais positivos apresentam e que inclusive caracterizam o grupo (LETESSON et al., 1991).

Por serem as células dominantes no leite e no tecido mamário de glândulas sadias e em lactação (SLADEK; RYZNAROVA; RYSANEK, 2006; CARNEIRO et al., 2009), durante o processo bacteriano, os macrófagos participam tanto da imunidade inata quanto da adquirida. As funções dos macrófagos são fagocitar e destruir a bactéria, eliminar gordura das glândulas mamárias em involução, colaborar na interação imunológica com os leucócitos (HAGELTORN; SAAD, 1986; POLITIS et al., 1992), fagocitose dos neutrófilos apoptóticos, minimizando desta forma, a liberação do conteúdo celular, que é tóxico para o tecido mamário (POLITIS et al., 1992; RAINARD; RIOLLET, 2006), além de desempenharem um papel importante no desencadeamento da resposta imune específica através da apresentação e o processamento do antígeno pelo MHC de classe II (RAINARD; RIOLLET, 2006).

Quando avaliadas as funções destas células, pode-se observar que a quantidade de peróxido de hidrogênio intracelular produzido e a fagocitose de *Staphylococcus aureus* pelos macrófagos CD14+ do leite e pelas células mononucleares CD14+ do sangue não foram diferentes entre os grupos. Resultados anteriormente obtidos pela equipe, em estudos realizados com monócitos sanguíneos *in vitro* em placas de cultura celular, pode-se observar que a liberação de peróxido de hidrogênio e a fagocitose por Zimonan foram reduzidas (BLAGITZ et al., 2008a; 2008b). Apesar de Politis et al. (1992) referirem que o *Staphylococcus aureus* induziu o aumento da expressão de MHC classe II pelos macrófagos. Apenas na fagocitose de *Escherichia coli* foram encontradas diferenças tanto no leite quanto no sangue. No leite, as vacas do grupo AL apresentaram menores índices de fagocitose de *Escherichia coli* pelos macrófagos CD14+ enquanto que no sangue as vacas do grupo LP foram as que apresentaram menores índices de fagocitose de *Escherichia coli* pelas células mononucleares CD14+. Em outro estudo, Politis et al. (1991) observaram que a presença do LPS não interferiu na expressão de MHC classe II. Estas diferenças encontradas em ambos estudos reforça a possibilidade de interferência do VLEB nestas células.

As vacas do grupo AL apresentaram maior CCS automática do que as vacas dos outros grupos. Apesar de terem avaliado os fagócitos, sem a classificação em mononucleares e polimorfonucleares, Rivas et al. (2006) demonstraram por meio da avaliação de vacas com alta e baixa celularidade que a capacidade fagocítica é menor em vacas com alta

celularidade, o que poderia ser uma das explicações da redução desta função nas vacas do grupo AL.

Os resultados do sangue concordaram com Azedo et al. (2008), apesar destes autores terem avaliado funções fagocíticas dos leucócitos sanguíneos totais, estes observaram que as vacas do grupo LP tiveram uma redução desta função. Werling et al. (1998), também observaram menor índice de fagocitose mediada pelo receptor $Fc\gamma$, em células obtidas de bovinos naturalmente infectados pela LEB.

A morte celular por apoptose é fundamental para a resolução de processos inflamatórios, principalmente os relacionados à glândula mamária (SLADEK; RYSANEK, 2000; SLADEK et al., 2005; SLAMA et al., 2009; VAN OOSTVELDT et al., 2001). Na literatura há descrições sobre a apoptose dos linfócitos e das células polimorfonucleares. Até o momento, o primeiro relato de apoptose em macrófagos da glândula mamária de bovinos foi descrito por Sladek e Rysanek (2010) que trabalharam com macrófagos residentes de novilhas virgens.

Mediante a ausência destas informações na literatura, principalmente referente a glândula mamária de animais infectados pelo VLEB, a morte celular destas células foi avaliada. Pôde-se observar que enquanto os macrófagos CD14⁺ do leite das vacas dos grupos AL e LP apresentaram menores índices de morte por apoptose do que as vacas do grupo negativo, no sangue estas diferenças não foram visualizadas. Pelo fato das vacas LP apresentarem maior homogeneidade das amostras de leite, pôde-se dizer que a redução da morte por apoptose dos macrófagos CD14⁺ foi causada pela maior quantidade de macrófagos residentes com características de monócitos, que por serem recém migrados do sangue periférico apresentaram menor índice de morte por apoptose (SLADEK; RYSANEK, 2010). Mas deve-se observar que o grupo mais heterogêneo, composto por vacas do grupo AL, também apresentaram menor índice de morte por apoptose. Para Sladek e Rysanek (2010) a apoptose de macrófagos inflamatórios é importante para a resolução do processo inflamatório. Portanto, pode-se dizer que as vacas do grupo AL, aparentemente, não apresentavam resoluções dos quadros inflamatórios e/ou infecciosos, cronificando a manifestação. Se apenas o grupo AL apresentasse esse comportamento, poderia ser sugerido que as mamites inaparentes – subclínicas – evoluem para uma modulação do processo inflamatório, mas as vacas do grupo LP também diminuíram seus índices de apoptose, apesar de todas as amostras serem negativas no exame bacteriológico, tornando plausível que esta redução seja uma interferência viral nestas células.

No leite, os macrófagos CD14+ das vacas do grupo LP apresentaram maiores índices de morte por necrose do que as vacas dos grupos negativo e AL, e estas tiveram maiores índices de morte por necrose do que as vacas do grupo negativo. No sangue, as células mononucleares CD14+ das vacas LP apresentaram menores índices de necrose que as vacas dos grupos negativo e AL.

Apesar do grupo AL ter sido composto por amostras heterogêneas, tanto na CCS automática quanto no exame bacteriológico, os macrófagos CD14+ do leite que apresentaram maiores índices de morte por necrose foram das vacas do grupo LP, seguida das vacas do grupo AL. Como a ligação do LPS (lipopolisacarídeo) com CD14 é aumentada na presença de uma proteína de fase aguda chamada proteína de ligação de LPS (*LPS-binding*) que forma um complexo com LPS para a sua apresentação ao CD14 (BAUMERT et al., 2009), isto explicaria o aumento da necrose dos macrófagos CD14+ das vacas do grupo AL em relação as vacas do grupo negativo. Mas seria esperado que no grupo sem isolamento bacteriano e com menor CCS automática, o grupo LP, essa proteína estivesse ainda menos disponível e o fenômeno de necrose não exuberasse. O aumento da necrose nas vacas do grupo AL em relação ao grupo negativo pode ser explicado por este fator. Essa diferença provavelmente deveu-se a ação do vírus que no caso do sangue, preservou sua interferência mais frequentemente descrita que é a diminuição da apoptose nos animais infectados (SOUZA, 2010). Deve-se destacar que além das variações da LEB observadas entre os grupos, outras variáveis como a celularidade do leite, a variação individual da defesa mamária (PICCININI et al., 1999; BANNERMAN et al., 2004; BAUMERT et al., 2009) e o predomínio dos subgrupos dos fagócitos (RIVAS et al., 2002) não podem ser descartados.

Esta oposição de resultados entre as amostras de leite e de sangue, também foi observada na morte celular por apoptose e/ou necrose. No leite, os macrófagos CD14+ das vacas do grupo LP apresentaram maiores índices de morte e/ou apoptose do que as vacas do grupo negativo. No sangue, as células mononucleares CD14+ das vacas do grupo LP apresentaram menores índices do que as vacas dos grupos negativo e AL, e estas apresentaram maiores índices do que as vacas do grupo negativo.

Quanto a viabilidade no leite, os macrófagos CD14+ de vacas dos grupos AL e LP apresentaram maior viabilidade do que as vacas do grupo negativo. Isto é explicado pelo fato das vacas dos grupos AL e LP apresentarem menor morte celular. Consequentemente as células permaneceriam viáveis por mais tempo na glândula mamária e o recrutamento das células do sangue seria menor. Antes de analisar estas amostras no citômetro de fluxo, a menor viabilidade celular no leite de vacas do grupo negativo foi percebida durante a prova de

viabilidade por exclusão por Azul de Tripán, conforme descrito anteriormente. Há várias possibilidades que podem explicar o aumento da viabilidade e a redução da apoptose nestes grupos. Sabe-se que a mamite inaparente – subclínica – causa aumento dos índices de viabilidade leucocitária (BOUTET et al., 2004; MEHRZAD; DUCHATEAU; BURVENICH, 2004), explicada pelo maior recrutamento na glândula mamária e pela migração de células com características de células sanguíneas, que apresentam um tempo de vida maior. Uma outra possibilidade seria explicada por Burton et al. (2003) e Baumert et al. (2009). Estes observaram que os leucócitos residentes foram considerados mais vulneráveis, menos viáveis, menos hábeis à estimulação e também menos imunocompetentes quando comparados às células recém migradas do sangue após a estimulação por um patógeno. No sangue, as vacas do grupo LP apresentaram maior viabilidade do que as vacas dos grupos negativo e AL.

Descartando a possibilidade da mamite causar alterações na viabilidade e na apoptose dos macrófagos CD14+, representada pelo grupo AL, pode-se dizer que o grupo LP, sem indícios de mamite, apresentou interferências do VLEB nos macrófagos CD14+ do leite e nas células mononucleares CD14+ do sangue.

6.1.2 Avaliação funcional das populações de fagócitos polimorfonucleares sanguíneos e lácteos

As células polimorfonucleares, em glândulas mamárias sadias, estão presentes em menores quantidades. Na presença de um processo inflamatório chegam a ser as células predominantes, com aumento de até 90% (PARK et al., 1992; POLITIS et al., 1992; PILLAI et al., 2001; PAAPE et al., 2002; 2003; ZHAO; LACASSE, 2008). Apesar da diversidade na celularidade e do exame bacteriológico, principalmente nas vacas do grupo AL, não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto a quantidade de leucócitos CH138+ do leite e de células polimorfonucleares CH138+ do sangue.

As células polimorfonucleares são as principais células envolvidas na resposta imune inata contra os patógenos invasores (PAAPE et al., 2003) por meio da fagocitose, e expressam vários *pattern recognition receptors* (PRRs). Durante este processo ocorre a produção de superóxidos, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso que são altamente eficientes na destruição dos patógenos (KOBAYASHI et al., 2003; WERLING; PIERCY; COFFEY, 2006; CONEJEROS et al., 2011). Estas células migram continuamente

para a glândula mamária em pequenas quantidades, compondo inclusive o grupo de células residentes (SLADEK; RYSANEK, 2010), mas diante de um processo infeccioso, estas migram rapidamente para o foco inflamatório (DIEZ-FRAILE; MEYER; BURVENICH, 2002; PAAPE et al., 2002; PRIN-MATHIEU et al. 2002).

Embora não tenham sido observadas diferenças nas quantidades destas células, os leucócitos CH138+ do leite das vacas do grupo LP apresentaram maior produção de peróxido de hidrogênio do que o das vacas do grupo negativo. É interessante observar que as células polimorfonucleares do leite, em condições normais, apresentam uma menor produção intracelular de peróxido de hidrogênio (MEHRZAD et al., 2001), decorrente da diapedese do sangue periférico para a glândula mamária (SMITS et al., 1999). Partindo deste princípio, as vacas do grupo LP deveriam ter a produção intracelular de peróxido de hidrogênio reduzida. Pois as amostras de leite destas vacas eram mais homogêneas quanto à celularidade do que as outras e eram negativas no exame bacteriológico. A explicação mais aceitável para tal, seria a interferência viral na glândula mamária. Uma forma dos leucócitos polimorfonucleares responderem à presença do VLEB seria com maior produção de peróxido de hidrogênio, até porque apesar de não ser a resposta mais específica à infecção viral, esse grupo também manifestou aumento da necrose nessa população celular.

Quanto aos índices da fagocitose no leite, não foram observadas diferenças na fagocitose de *Staphylococcus aureus* pelos leucócitos CH138+. Porém na fagocitose de *Escherichia coli* pelos leucócitos CH138+ observou-se que as vacas do grupo AL apresentaram menores índices do que as vacas do grupo negativo e LP.

De acordo com os resultados observados nas fagocitoses tanto de *Staphylococcus aureus* quanto de *Escherichia coli* pelos leucócitos CH138+, o VLEB não causou nenhuma interferência direta. A redução da fagocitose de *Escherichia coli* pelos leucócitos CH138+ nas vacas do grupo AL pode ser explicada pela redução da resposta a LPS em processos crônicos (PAAPE et al., 1992).

Apesar de não ter registros sobre o número de partos das vacas utilizadas no presente estudo, sabe-se que algumas vacas primíparas foram incluídas. Mehrzad, Duchateau, Burvenich (2009) durante a avaliação da fagocitose de *Staphylococcus aureus* em vacas primíparas e multíparas pelas células polimorfonucleares, observaram uma pronunciada redução da atividade fagocítica tanto das células do sangue quanto do leite de vacas multíparas. Comprovando desta forma haver uma diferença na resolução ou na persistência de infecções mamárias entre as vacas primíparas e multíparas.

No sangue, as células polimorfonucleares CH138+ das vacas do grupo LP apresentaram menores índices de produção de peróxido de hidrogênio intracelular, fagocitose de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli* do que as vacas do grupo negativo. Esta redução da produção de peróxido de hidrogênio intracelular e da função fagocítica pode ser explicada pelos resultados obtidos do estudo de Schwartz et al. (1994). Estes verificaram que o VLEB infecta as células polimorfonucleares, prejudicando a função destas células. Azedo (2007) e Azedo et al. (2008) apesar de terem trabalhado com leucócitos sanguíneos totais, também observaram uma redução da produção de peróxido de hidrogênio intracelular e da fagocitose nos animais positivos com LP. Já Souza (2010), que também trabalhou com leucócitos sanguíneos totais, não encontrou diferenças na produção de peróxido de hidrogênio intracelular e na capacidade fagocítica nas vacas do grupo LP. Este autor (SOUZA, 2010) considerou que a redução da produção de peróxido de hidrogênio intracelular e da capacidade fagocítica foi decorrente da menor porcentagem de células polimorfonucleares nestas vacas devido ao aumento expressivo de linfócitos. Fato que não pôde ser considerado no presente estudo, pois foi comprovado por meio de marcações com anticorpos específicos para células polimorfonucleares – CH138 – que não houve alteração da expressão destas células nos diferentes grupos. Um fator que pode ter sido limitante para Souza (2010) foi o número de animais utilizados, visto que, por ter trabalhado com estresse oxidativo, os critérios de inclusão amostral do seu estudo foram mais específicos. Outros autores, apesar de não terem classificado os grupos de animais com LP, também não observaram redução da capacidade fagocítica nos animais positivos (KACZMARCZYK et al., 2005). Neste caso, a ausência da subdivisão dos animais positivos para a LEB implicou em resultados imparciais. Diante destas observações, pode-se dizer que a redução da produção de peróxido de hidrogênio intracelular e da capacidade fagocítica é consequência da interferência viral nas funções destas células.

A apoptose das células polimorfonucleares além de prevenir o aumento do processo inflamatório, funcionam como um estímulo anti-inflamatório para as outras células (VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000; FOX, 2010). Sabe-se que a apoptose das células polimorfonucleares é acompanhada por uma perda significativa da capacidade fagocítica (SLADEK; RYSANEK, 2011), o que não pôde ser observado no presente estudo.

Na avaliação da morte celular no leite, observou-se que enquanto os leucócitos CH138+ das vacas dos grupos AL e LP apresentaram menores índices de morte por apoptose do que as vacas do grupo negativo, os leucócitos CH138+ das vacas do grupo LP apresentaram maiores índices de morte por necrose do que as vacas dos grupos negativo e

AL. Na presença de um processo infeccioso, os neutrófilos são os responsáveis pelo reconhecimento e pela destruição dos patógenos invasores e os macrófagos são os responsáveis pela eliminação destes neutrófilos por meio da fagocitose (VAN OOSTVELDT et al., 2002; YAGI et al., 2002; RYSANEK et al., 2006). Esta fagocitose, não só impede que o conteúdo intracelular dos neutrófilos extravasem e exacerbem o processo inflamatório como também estimulam a secreção de TGF- β e IL-10, responsáveis pela inibição da secreção de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α (HUYNH; FADOK; HENSON, 2002). Diante de um processo infeccioso intenso e/ou agudo, devido a grande quantidade de neutrófilos, os macrófagos não conseguem eliminar os que estão entrando em apoptose e neutrófilos acabam liberando o conteúdo citoplasmático para a glândula mamária, o que é tóxico para as outras células e provocam a morte destas por necrose. Somando-se a isto, sabe-se que, durante a mamite inaparente ocorre um atraso na apoptose destes neutrófilos (BOUTET et al., 2004). Este atraso, poderia explicar a redução dos índices de apoptose dos leucócitos CH138+ das vacas do grupo AL, mas sem descartar a possível interferência viral. Acontece que, as vacas do grupo LP não apresentaram infecções e indícios de processo inflamatório e portanto a apoptose e a necrose deveriam estar semelhantes ou em condições mais favoráveis do que os outros grupos. Neste caso, fica evidente que há uma interferência viral que provocou a redução da apoptose e o aumento da necrose nas vacas do grupo LP.

Apesar deste aumento na morte por necrose nas vacas do grupo LP, as vacas dos grupos AL e LP apresentaram maior viabilidade celular do que as vacas do grupo negativo.

Pelo fato das vacas do grupo LP apresentarem menor celularidade e não terem apresentado isolamento bacteriano, pode-se dizer que o VLEB reduziu a morte destas células por apoptose e com isto houve um aumento da viabilidade celular. As alterações na viabilidade nestas células das vacas do grupo AL poderiam ser explicadas pela variedade celular e bacteriológica que as amostras de leite das vacas destes grupos apresentaram. Lembrando que a meia vida dos neutrófilos na glândula mamária sadia é de apenas 4 a 10 horas (SMITH, 1994). Além disso, diante de um processo infeccioso e/ou inflamatório, a rápida diapedese das células polimorfonucleares para a glândula mamária poderia explicar o atraso da apoptose e o aumento da viabilidade celular no local da infecção (MEHRZAD; DUCHATEAU; BURVENICH, 2004). Para estes autores, a baixa viabilidade das células polimorfonucleares residentes poderia ser considerada um fator de risco para a mamite por bactérias gram-negativas. Outro fator que poderia interferir na viabilidade das células polimorfonucleares seria a fase da lactação. De acordo com Mehrzad et al. (2001), na fase

inicial da lactação ocorre diminuição da quantidade e de viabilidade das células polimorfonucleares. Esta interferência não pode ser observada no presente estudo, visto que proporcionalmente o grupo que apresentou maior quantidade de vacas que estavam no início da lactação foi o grupo negativo. Além disso, deve-se lembrar que as células do leite apresentam uma viabilidade menor do que as células do sangue (RIVAS et al., 2001) pelo fato da glândula mamária sadia ser constituída praticamente de células residentes. Estas células migraram para a glândula mamária com a finalidade de manter a proteção imunológica em níveis basais. Além deste fator fisiológico, outro fator que pode interferir na viabilidade destas células seria as diferentes etapas de lavagem e centrifugação. Para a avaliação funcional do leite, esta etapa pode ser minimizada por meio da redução do tempo de centrifugação (PIEPERS et al., 2009), conforme foi estabelecido no presente estudo, mas não pode ser substituída.

No sangue, não foram observadas diferenças quanto a morte por apoptose entre os grupos. As células polimorfonucleares CH138+ das vacas do grupo LP apresentaram menores índices de morte por necrose e morte por apoptose e/ou necrose do que as vacas do grupo negativo. Consequentemente, as células polimorfonucleares CH138+ das vacas do grupo LP apresentaram maior viabilidade do que as vacas do grupo negativo. Entretanto, Azedo (2010) observou menores índices de morte por apoptose em leucócitos totais de vacas do grupo LP e não observou alterações nos índices de morte por necrose.

6.2 AVALIAÇÃO DOS LINFÓCITOS SANGUÍNEOS E LÁCTEOS

A interação entre patógenos invasores e o sistema imune é o fator determinante para o desencadeamento da infecção (SOLTYS; QUINN, 1999). Consequentemente, uma resposta imune efetiva requer o recrutamento tanto de neutrófilos e macrófagos quanto de linfócitos para o local da inflamação, afinal estes são responsáveis pelo desencadeamento da segunda parte da resposta imune: imunidade humoral (VAN KAMPEN et al., 1999). Pensando nesta interação entre a imunidade inata e a humoral e a importância da LEB nestas células, procurou-se quantificar e avaliar os linfócitos.

6.2.1 Avaliação das populações e subpopulações de linfócitos sanguíneos e lácteos

Após a avaliação dos fagócitos do sangue e do leite, optou-se por quantificar os linfócitos T e os linfócitos B, por desempenharem um importante papel na resposta imune principalmente no reconhecimento de antígenos com alto grau de especificidade, para agir como células efetoras e para regular a natureza e a intensidade da resposta imune (PARK et al., 1993; TAYLOR et al., 1997; ASAI et al., 1998; 2000; KIMURA et al. 1999; KEHRLI JUNIOR; HARP, 2001; LUN et al., 2007).

Os linfócitos T são células capazes de uma ampla variedade de funções efetoras, incluindo as funções citotóxicas e supressoras. O predomínio destas células na glândula mamária sugere que os linfócitos desempenham um papel importante tanto na manutenção da integridade da glândula mamária quanto na defesa da vaca contra mamites (TAYLOR et al., 1997; YAMAGUCHI, et al., 1999; ASAI et al., 2000; KEHRLI JUNIOR; HARP, 2001; HARP et al., 2004; LUN et al., 2007). Estudo realizado por Harp et al. (2004) comprovou que o aumento da expressão de moléculas de migração pelos linfócitos T no leite comparados com o sangue sugeriram que há um recrutamento seletivo destas células da circulação sanguínea para a glândula mamária. A real influência dos linfócitos T na resposta imune da glândula mamária foi comprovada por Harp et al. (2006). Estes autores avaliaram a expressão das moléculas de adesão e migração dos linfócitos em dois tipos de infecções, uma delas causada por *Serratia marcescens* e outra causada por *Streptococcus uberis* e verificaram que na infecção por *Serratia marcescens* a imunofenotipagem dos linfócitos eram de células recém recrutadas da corrente sanguínea. Os autores consideram que o aparecimento de sinais clínicos mais brandos nesta infecção foi resultante do maior recrutamento destas células para a glândula mamária, embora não possa desconsiderar os fatores de patogenicidade dos mesmos.

Semelhante às células sanguíneas, o tecido mamário e o leite dos bovinos são compostos por uma variedade de subpopulações de linfócitos T (ASAI et al., 2000). Pensando nesta variedade, a quantidade total de linfócitos T (CD3+), seus subgrupos de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) e de linfócitos citotóxicos (CD3+ CD8+) foram identificados.

No leite, a quantidade de linfócitos T (CD3+) das vacas positivas para a LEB foi maior do que as vacas do grupo negativo. As vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) do que as vacas negativas, mas diferenças não foram observadas entre os grupos na quantidade de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+). Por este motivo, a relação entre CD4+:CD8+ do grupo LP foi maior.

Park et al. (1992) observaram que a quantidade de linfócitos da glândula mamária em lactação difere da do sangue e estas diferenças podem estar associadas a alterações na atividade funcional destas células. Estes autores também observaram que os linfócitos T citotóxicos (CD8+) estão presentes em grandes quantidades durante toda a lactação e aumentados durante processos infecciosos da glândula mamária (RIOLLET; RAINARD; POUTREL, 2001), como resposta contra as infecções também confirmado por Park et al. (1993). Para estes autores, em processos infecciosos causados pelo *Staphylococcus aureus* a quantidade de linfócitos T auxiliares (CD4+) são menores devido a ativação dos linfócitos T citotóxicos (CD8+). Asai et al. (2000) observaram que durante a lactação, os linfócitos T (CD8+) estão presentes em maior quantidade do que os linfócitos T (CD4+) nos tecidos mamários e no leite. Estes autores afirmaram que a presença destes linfócitos T nas proximidades do epitélio sugere que estas células desempenhem um papel fundamental na manutenção da integridade da glândula mamária, por meio da remoção de células danificadas ou infectadas. Durante o período seco, Asai et al. (2000) observaram que a quantidade de linfócitos T (CD8+) foi menor do que a quantidade de linfócitos T (CD4+). O que pode ser uma das explicações para o período seco da vaca ser considerado o período de maior susceptibilidade às novas infecções. Situação semelhante pôde ser observada no presente estudo, apesar da fase da lactação não ter sido analisada, pôde-se verificar que nas vacas do grupo LP, a quantidade de linfócitos T CD8+ foi reduzida. Lembrando que os linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) são responsáveis pela eliminação das células infectadas pelo vírus quando estas apresentam os antígenos virais por meio de moléculas de MHC classe I (ABBAS et al., 2008). Assim como as vacas que estão no período seco, as vacas do grupo LP apresentam uma deficiência na defesa da glândula mamária, fator que pode ser importante para a susceptibilidade às infecções. Deve-se ressaltar que a maioria das vacas do grupo LP estavam no final da lactação, este pode ser um dos motivos que explicaria o aumento da relação entre CD4+:CD8+ (ASAI et al., 1998). Esta relação é explicada pela proporção de linfócitos T que expressam CD4 para os que expressam CD8. Esta relação é geralmente avaliada no diagnóstico da LEB.

Nas amostras de sangue, houve uma redução da quantidade de linfócitos T (CD3+) nas vacas dos grupos AL e LP. Esta redução é explicada pelo aumento da quantidade de linfócitos B nestes animais. Estes resultados também foram observados por Williams et al. (1988), Gatei et al. (1989), Azedo (2010) e Souza (2010). Outros autores encontraram um aumento na quantidade de linfócitos T nas vacas infectadas pelo VLEB (WU et al., 1999).

Estas diferenças não foram observadas no leite, mas nas amostras de sangue das vacas do grupo LP foi encontrada menor quantidade de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+), população que não é infectada pelo VLEB. Azedo (2010) observou uma redução da quantidade de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) e uma redução da quantidade de linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) nas vacas do grupo LP, diferença que não foi observada entre os grupos no presente estudo. Gatei et al. (1989), semelhante ao Azedo (2010) também encontraram uma redução da quantidade de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) e de linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) nas vacas do grupo LP. Já Taylor et al. (1992) não observaram nenhuma alteração na quantidade das subpopulações de linfócitos T em vacas do grupo LP. Kimura et al. (1999) quantificou as populações de linfócitos T (CD3+), de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) e de linfócitos T citotóxicos (CD3+ CD8+) em vacas no período de periparto e pós parto. Estes autores observaram que durante o periparto houve uma queda da quantidade de linfócitos T auxiliares (CD4+) e citotóxicos (CD8+) sanguíneos sugerindo uma imunossupressão neste período. Apesar de ter observado resultados opostos no estudo de Stone et al. (2000), acredita-se que os linfócitos T auxiliares (CD4+) e os linfócitos T citotóxicos (CD8+) por serem células efectoras, inibem a proliferação dos linfócitos B e desempenham um papel na imunidade tumoral destes animais (Wu et al., 1999). Esta afirmação está de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, sendo portanto a explicação mais plausível para o fenômeno. As vacas do grupo LP apresentaram uma redução da quantidade de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+), o que prejudicou a inibição da proliferação dos linfócitos B, observados através do aumento da quantidade e da redução dos índices de morte destes linfócitos.

Portanto, a redução da quantidade de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+) no sangue dos animais explicaria uma provável deficiência imunológica destes animais e o aumento da quantidade de linfócitos B (CD21+). A mesma explicação pode ser transferida para o leite. Apesar de não ter sido observada diferenças na quantidade de linfócitos T auxiliares (CD3+ CD4+), a menor quantidade de linfócitos T citotóxico (CD3+ CD8+) explica a não inibição da proliferação de linfócitos B e consequentemente o aumento da quantidade destas células também no leite das vacas do grupo LP.

No leite, as vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de linfócitos B (CD21+) do que as vacas dos grupos AL e negativo e as vacas do grupo AL apresentaram maior quantidade de linfócitos B (CD21+) do que as vacas do grupo negativo. Estes resultados comprovam que o VLEB induz ao aumento da quantidade de linfócitos B (DEPELCHIN et al., 1989; GATEI et al., 1989; LETESSON et al., 1990; 1991; STONE;

HOF; DAVIS, 1995; GILLET et al., 2007) também no leite. Não foram encontradas diferenças na quantidade de linfócitos B CD21+ CD5+ entre os grupos. As vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de linfócitos B CD21+ CD11b+ e de linfócitos B CD21+ CD5+ CD11b+ do que as vacas do grupo negativo. Resultados opostos foram observados na quantidade de linfócitos B CD21+ CD5- CD11b-. As vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de linfócitos B CD21+ CD5- CD11b- do que as vacas dos grupos negativo e AL.

Sabe-se que animais infectados pelo VLEB e que manifestam LP apresentam maior quantidade de linfócitos B circulantes (DEPELCHIN et al., 1989; GATEI et al., 1989; LETESSON et al., 1990; 1991; STONE; HOF; DAVIS, 1995; MEIROM et al., 1997; GILLET et al., 2007). Concordando com estes autores, no presente estudo as amostras de sangue das vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de linfócitos B (CD21+) do que as vacas dos grupos AL e negativo e as vacas do grupo AL apresentaram maior quantidade de linfócitos B (CD21+) do que as vacas do grupo negativo. Azedo (2010) e Souza (2010) também observaram este aumento, mas estas diferenças ficaram concentradas apenas nas vacas LP. Isaacson et al. (1998) apesar de terem trabalhado com vacas que não apresentaram linfocitose, estes autores concordaram integralmente com os resultados obtidos no presente estudo. Mesmo nos animais sem indícios de infecções persistentes pelo VLEB houve um aumento da quantidade de linfócitos B. Já Taylor et al. (1992) afirmaram que o aumento da quantidade de linfócitos B está correlacionado ao aumento da quantidade de linfócitos T auxiliares (CD4+) e de linfócitos T citotóxicos (CD8+), fato que não foi observado no presente estudo.

As vacas do grupo AL apresentaram menor quantidade de linfócitos B CD21+ CD5+ do que as vacas do grupo negativo. As vacas dos grupos AL e LP apresentaram menor quantidade de linfócitos B CD21+ CD11b+ do que as vacas do grupo negativo e as vacas do grupo AL apresentaram menor quantidade de linfócitos B CD21+ CD11b+ do que as vacas do grupo negativo. As vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de linfócitos B CD21+ CD5+ CD11b+ do que as vacas dos grupos negativo e AL. Este aumento dos linfócitos B CD21+ CD5+ CD11b+ é explicado pelo tropismo do VLEB por estas células (SOUZA, 2010), embora saiba que o VLEB possa infectar os linfócitos B CD21+ CD5- CD11b- (SCHWARTZ et al., 1994; FLORINS et al., 2007), fato não observado no presente estudo, onde as vacas do grupo LP apresentaram menor quantidade de linfócitos B CD21+ CD5- CD11b-. Souza (2010) explica que o aumento da quantidade de linfócitos B CD21+ CD5+ CD11b+ se deve a modulação do processo apoptótico e o tropismo pelos linfócitos B que o VLEB exerce, principalmente sobre estas células.

É interessante observar que enquanto o sangue das vacas do grupo LP apresentaram maior quantidade de linfócitos B CD21+ CD5+ CD11b+, o leite destas apresentaram menor quantidade. Pode-se dizer que o VLEB interferiu na expressão destas células no sangue, mas por fatores compensatórios, não conseguiu interferir no leite destes animais.

6.2.2 Avaliação da morte dos linfócitos B sanguíneos e lácteos

Avaliar os processos de morte dos linfócitos B de animais infectados pelo VLEB busca interceptar interferências do vírus sobre o ciclo da célula alvo da doença.

Estudos anteriores relacionaram o VLEB a quantidade e a função dos linfócitos sanguíneos (Wu et al., 1999; TAKAHASHI et al., 2004). Pelo fato deste estudo ser pioneiro na avaliação da interferência do VLEB nos fagócitos e nos linfócitos da glândula mamária, até o presente momento o registro da indução da morte dos linfócitos B pelo VLEB pode aqui ser visualizado com exclusividade.

Durante o levantamento bibliográfico realizado para a confecção do estudo em questão, pôde-se observar uma importância maior do que se imaginava na quantificação (YAMAGUCHI, et al., 1999; ASAI et al., 2000; HARP et al., 2004; 2006; LUN et al., 2007) e na função dos linfócitos T (SLAMA et al., 2009) e nenhum estudo foi encontrado na literatura que quantificassem e que avaliassem diretamente os linfócitos B. Acredita-se que pelo fato de estarem em quantidades menos expressivas no leite (RIOLLET; RAINARD; POUTREL, 2001) e por não desempenharem uma função direta na resposta imune da glândula mamária, estas células não têm sido diretamente avaliadas pelos estudos relacionados com a mamite. Como este estudo tem a LEB como principal protagonista, não seria possível se abster de incluir a avaliação do linfócito B, também na glândula mamária.

Portanto no leite, pode-se observar que os linfócitos B (CD21+) das vacas do grupo LP apresentaram menores índices de morte por apoptose do que as vacas dos grupos AL e negativo e as vacas do grupo AL apresentaram menores índices de morte por apoptose de linfócitos B (CD21+) do que as vacas do grupo negativo. As vacas positivas para a LEB apresentaram maiores índices de morte por necrose de linfócitos B (CD21+) do que as vacas do grupo negativo. Os linfócitos B (CD21+) das vacas do grupo LP apresentaram maior viabilidade do que os linfócitos B (CD21+) das vacas dos grupos negativo e AL.

No sangue, as vacas do grupo LP apresentaram menores índices de morte por apoptose, por necrose e por apoptose e/ou necrose (apoptose tardia ou necrose secundária) do que as vacas dos grupos negativo e AL. Os linfócitos B (CD21+) das vacas do grupo LP apresentaram maior viabilidade do que as vacas dos grupos negativo e AL. Estes resultados confirmam a hipótese de Takahashi et al. (2004) onde os linfócitos B infectados que não expressavam o VLEB estavam sujeitos a sofrerem menos morte por apoptose (gp51, gp24, gp30).

Diante destes resultados, pode-se dizer que o VLEB interfere na morte por apoptose e na viabilidade dos linfócitos B presentes na glândula mamária. O que surpreendeu foi o aumento da morte por necrose dos linfócitos B da glândula mamária das vacas dos grupos AL e LP. O que indica a presença de dano tecidual na glândula mamária causado pelo VLEB.

6.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÕES

Finalmente, buscou-se correlacionar a imunofenotipagem a dois principais marcadores de mamite bovina, que seriam a CCS e o exame bacteriológico.

Em relação a CCS automática e a quantidade de linfócitos T (CD3+), foi observado uma correlação positiva e fraca e uma correlação positiva e média da CCS com a quantidade de leucócitos CH138+. Já com os macrófagos CD14+, foi observada uma correlação negativa e fraca. Com estes resultados pode-se dizer que nem sempre o aumento da CCS implica na diminuição da quantidade de macrófagos CD14+.

Foi observada uma correlação positiva e média entre o exame bacteriológico e a CCS. Diante destes resultados, pode-se dizer que as amostras negativas no exame bacteriológico apresentaram a menor celularidade. Foi observado que nas infecções causadas pelo *Corynebacterium bovis* houve uma menor celularidade entre as amostras positivas, seguida pelas amostras infectadas pelo *Staphylococcus chromogenes* e pelo *Streptococcus dysgalactiae*. Tal resultado está de acordo com o encontrado por Schepers et al. (1993), que estimou o aumento de CCS que determinados microorganismos causam, sendo os menores valores encontrados, em ordem crescente, para *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus chromogenes* e *Streptococcus dysgalactiae*.

Em relação ao exame bacteriológico e a quantificação dos leucócitos na citometria de fluxo, foi observada uma correlação positiva fraca entre o exame bacteriológico e a quantidade de linfócitos T (CD3+), entre o exame bacteriológico e a quantidade de leucócitos CH138+ foi observada uma correlação positiva e média entre o exame bacteriológico e a quantidade de macrófagos CD14+ foi observada uma correlação negativa e fraca. Não foram observadas correlação do exame bacteriológico com a quantidade de linfócitos B CD21+.

Estes resultados implicam em dizer que nas amostras negativas haviam uma menor quantidade de linfócitos T (CD3+), leucócitos CH138+ e maior quantidade de macrófagos CD14+. Nas amostras infectadas pelo *Streptococcus dysgalactiae* haviam maior quantidade de linfócitos T (CD3+), leucócitos CH138+ e menor quantidade de macrófagos CD14+. Resultados que comprovariam o predomínio de macrófagos em amostras negativas no exame bacteriológico (SLADEK; RYZNAROVA; RYSANEK, 2006; CARNEIRO et al., 2009).

O mais interessante desses últimos resultados é a similaridade da importância da CCS e do exame bacteriológico à celularidade do leite e conseqüente processo inflamatório da glândula mamária.

7 CONCLUSÕES

Houve alterações da atividade funcional dos fagócitos de animais naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina, tanto no sangue quanto no leite. No entanto, ressalta-se que:

A) As células do sangue dos animais testados repetiram as descrições da literatura com maiores interferências do vírus no linfócito B, morte e diminuição da função fagocítica principalmente dos neutrófilos.

B) Na avaliação das células do leite, foi significativa a presença de células mononucleares no leite de animais infectados, independentemente do perfil hematológico, com maior influência nos mecanismos de morte celular (aumento de viabilidade, diminuição da apoptose e aumento da necrose) sugerindo interferência direta no vírus nessas respostas.

C) As alterações encontradas na população de neutrófilos dos animais com linfocitose persistente foi mais evidente, uma vez que apesar de não haver diferença na expressão de CH138 tanto no sangue quanto no leite, neste, houve potencialização da necrose e da produção intracelular de peróxido de hidrogênio, sem infecção bacteriana associada, uma vez que todas as amostras eram negativas no exame bacteriológico.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, SHIV. *Imunologia celular e molecular*. 6.edição (tradução). Rio de Janeiro: Elsevier, 2008 . 564p.
- ALTREUTHER, G.; LLAMES, L.; NEUENSCHWANDER, S.; LANGHANS, W.; WERLING, D. Morphologic and functional changes in bovine monocytes infected in vitro with the bovine leukaemia virus. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 54, p. 459-469, 2001.
- ASAI, K.; KAI, K.; RIKIISHI, H.; SUGAWARA, S.; MARUYAMA, Y.; YAMAGUCHI, T.; OHTA, M.; KUMAGAI, K. Variation in CD4+ T and CD8+ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 65, p. 51-61, 1998.
- ASAI, K.; KOMINE, Y.; KOZUTSUMI, T.; YAMAGUCHI, T.; KOMINE, K.; KUMAGAI, K. Predominant subpopulations of T lymphocytes in the mammary gland secretions during lactation and intraepithelial T lymphocytes in the intestine of dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, p. 233-240, 2000.
- AZEDO, M. R. **Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa de leucócitos**. 2007. 154 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- AZEDO, M. R. **Influência do vírus da leucose bovina na resposta imunitária de animais naturalmente infectados**. 2010. 160 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- AZEDO, M. R.; MASSOCO, C. O.; BLAGITZ, M. G.; SANCHES, B. G. S.; SOUZA, F. N.; BATISTA, C. F.; SAKAI, M.; SÁ-ROCHA, L. C.; KFOURY-JÚNIOR, J. R.; STRICAGNOLO, C. R.; BENESI, F. J.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Influência da leucose enzoótica bovina na função fagocítica de leucócitos circulantes em animais manifestando linfocitose persistente. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 5, p. 390-397, 2008.
- BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; LEE, J. W.; ZHAO, X.; HOPE, J. C; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 3, p. 463-472, 2004.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility tests by standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BAUMERT, A.; BRUCKMAIER, R. M.; WELLNITZ, O. Cell population, viability, and some key immunomodulatory molecules in different milk somatic cell samples in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v. 76, p. 356-364, 2009.

BEYER, J.; KOLLNER, B.; TEIFKE, J. P.; STARICK, E.; BEIER, D.; REIMANN, I.; GRUNWALD, U.; ZILLER, M. Cattle infected with Bovine Leukaemia Virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 49, p. 270-277, 2002.

BIRGEL, E. H. Semiologia da glândula mamária de ruminantes. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. São Paulo: Editora Roca, 2004. 807 p.

BIRGEL, E. H.; LARSSON, M. H. M. A.; HAGIWARA, M. K.; VASCONCELLOS, S. A.; LARSSON, C. E.; OGASSAWARA, S.; BENESI, F. J. **Patologia clínica Veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 177-213.

BLAGITZ, M. G. ; AZEDO, M. R. ; SOUZA, F. N. ; SPINOLA, T. R. ; SANCHES, B. G. S.; BATISTA, C. F. ; BENESI, A. Q. ; RIBEIRO, C.P. ; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Evaluation of macrophages function of naturally bovine leukemia virus dairy cows. In: XXV Congresso Mundial de Buiatria, 2008, Budapeste. Hungarian Veterinary Journal. Budapest, v. 130. p. 178-178. 2008a.

BLAGITZ, M. G. ; AZEDO, M. R. ; SOUZA, F. N. ; SPINOLA, T. R. ; SANCHES, B. G. S.; BATISTA, C. F. ; RIBEIRO, C.P. ; BENESI, F. J. ; DELLA LIBERA, A. M. M. P. . Reactive oxygen species production by monocyte-macrophage line cells in bovine leukemia virus infected dairy cows.. In: XXV Congresso Mundial de Buiatria, 2008, Budapeste. Hungarian Veterinary Journal, v. 130. p. 177-178. 2008b.

BOUTET, P.; BOULANGER, D.; GILLET, L.; VANDERPLASSCHEN, A.; CLOSSET, R.; BUREAU, F.; LEKEUX, P. Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4104-4114, 2004.

BRENNER, J.; VAN-HAAM, M.; SAVIR, D.; TRAININ, Z. The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 22, p. 299-305, 1989.

BRENNER, J.; ROSENTHAL, I.; BERNSTEIN, S.; TRAININ, Z. The fat content of milk from dairy cattle infected with bovine leukosis virus. **Veterinary Research Communications**. v.14. 1990. p. 167-171.

BROLUND, L. Cell counts in bovine milk. Causes of variation and applicability for diagnosis of subclinical mastitis. *Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum*. v.80, 1 – 123. 1985.

BUEHRING, G. C.; KRAMME, P. M.; SCHULTZ, R. D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. **Laboratory Investigation**, v. 71, n. 3, p. 359-365, 1994.

BUEHRING, G.C.; PHILPOTT, S.M.; CHOI, K.Y. Humans have antibodies reactive with bovine leukemia virus. **AIDS Research and Human Retroviruses**. v.19(12).2003. p. 1105-1113

BURTON, J. L.; ERSKINE, R. J. Immunity and mastitis some new ideas for an old disease. **The Veterinary Clinical Food Animal Practice**, v. 19, p. 1-45, 2003.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística : princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2003. 256p.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1934-1943, 2009.

CONEJEROS, I.; PATTERSON, R.; BURGOS, R. A.; HERMOSILLA, C.; WERLING, D. Induction of reactive oxygen species in bovine neutrophils is CD11b, but not dectin-1-dependent. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 139, p. 308-312, 2011.

CHO Y.S.; PARK S.Y.; SHIN H.S.; CHAN F. K. Physiological Consequences of Programmed Necrosis, an Alternative form of Cell Demise. **Molecules and Cells**.v. 29, p. 327-332. 2010.

D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Productive and reproductive performance in cattle infected with bovine leukosis virus. **Journal of Dairy Research**, v. 65, p. 693-695, 1998.

DARZYNKIEWICZ, Z.; BRUNO, S.; DEL BINO, G.; GORCZYCA, W.; HOTZ, M.A.; LASSOTA, P.; TRAGANOS, F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**.v.13 (8), p.795-808. 1992.

DE GIUSEPPE, A.; FELIZIANI, F.; RUTILI, D.; DE MIA, G. M. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, p. 147-151, 2004.

DEBACQ, C.; ASQUITH, B.; KERKHOF, P.; PORTETELLE, D.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Increased Cell Proliferation, but not Reduced Cell Death, Induces Lymphocytosis in Bovine Leukemia Virus-infected Sheep. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 15, p. 10048-10053, 2002.

DEPELCHIN, A.; LETESSON, J. J.; LOSTRIE-TRUSSART, N.; MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; BURNY, A. Bovine leukemia virus (BLV)-infected B-cells express a marker similar to the CD5 T cell marker. **Immunol. Lett.**, v. 20, n. 1, p. 69-76, 1989.

DIEZ-FRAILE, A.; MEYER, E.; BURVENICH, C. Regulation of adhesion molecules on circulating neutrophils during coliform mastitis and their possible immunomodulation with drugs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 86, p. 1-10, 2002.

DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H. D.; STÖBER, M. **Rosenberger**: exame clínico dos bovinos. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 419 p.

DIVERS, T. J.; PEEK, S. F. **Rebhun's disease of dairy cattle**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2008.

DOMÉNECH, A.; GOYACHE, J.; LLAMES, L.; PAYÁ, J.; SUÁREZ, G.; GÓMEZ-LUCÍA, E. In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 109-118, 2000.

DOSOGNE, H.; VANGROENWEGHE, F.; MEHRZAD, J.; MASSART-LEÉN, A. M.; BURVENICH, C. Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 828-834, 2003.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANIHOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). Virus taxonomy. **In: REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES**, 8., 2004, San Diego: Academic Press, 2004. 1162 p.

FERRER, J. F. Bovine leukosis: natural transmission and principles of control. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 175, n. 12, p. 1281-1286, 1979.

FETROW, J.; FERRER, J. F. Bovine leukemia virus infection and mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 881-882, 1982.

FLORINS, A.; BOXUS, M.; VANDERMEERS, F.; VERLAETEN, O.; BOUZAR, A. B.; DEFOICHE, J.; HUBAUX, R.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: a rationale for host susceptibility to disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, p. 1-7, 2008.

FOX, S.; LEITCH, A. E.; DUFFIN, R.; HASLETT, C.; ROSSI, A. G. Neutrophil apoptosis: Relevance to the innate immune response and inflammatory disease. **Journal of innate immunity**, v. 2 (3), 2010. p. 216-227.

GARCIA, M.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; BARROS FILHO, I. R. **Manual de semiologia e clínica dos ruminantes**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 247 p.

GATEI, M. H.; BRANDON, R. B.; NAIF, H. M.; MCLENNAN, M. W.; DANIEL, R. C. W.; LAVIN, M. F. Changes in B cell and T cell subsets in bovine leukaemia virus-infected cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 23, p. 139-147, 1989.

GERSTNER, A. O. H.; MITTAG, A.; LAFFERS, W.; DAHNERT, I.; LENZ, D.; BOOTZ, F.; BOCSI, J.; TARNOK, A. Comparison of immunophenotyping by slide-based cytometry and by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 311, p. 130-138, 2006.

GONZÁLEZ, E. T.; BONZO, E. B.; ECHEVERRÍA, M. G.; LICURSI, M.; ETCHEVERRIGARAY, M. E. Enzootic bovine leukosis: development of an indirect enzyme linked immunosorbent assay (I-ELISA) in seroepidemiological studies. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 37-42, 1999.

HAGELTORN, M.; SAAD, M. A. Flow cytofluorometric characterization of bovine blood and milk leukocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 9, p. 2012-2016, 1986.

HARMON, R. J.; EBERHART, D. E.; JASPER, B. E.; LANGLOIS, B. E.; WILSON, R. A. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infections**. 3. ed. Arlington: VA, National Mastitis Council, 1990. 34 p.

HARP, J. A.; STABEL, J. R.; PESCH, B. A.; GOFF, J. P. Expression of adhesion molecules on milk and blood lymphocytes from periparturient dairy cattle Johnes' disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 98, p. 69-76, 2004.

HARP, J. A.; WATERS, T. E.; GOFF, J. P.; BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J. Expression of lymphocyte homing and adhesion molecules during intramammary infection of cows with *Serratia marcescens* or *Streptococcus uberis*: correlation with bacterial colonization and clinical signs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 109, p. 13-21, 2006.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.

HEALD, M. T. S.; WALTNER-TOEWS, D.; JACOBS, R. M. The prevalence of anti-bovine leukemia virus antibodies in dairy cows and associations with farm management practices, production and culling in Ontario. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 14, p. 45-55, 1992.

HILLERTON, J.E.; BERRY, E.A.. Treating mastitis in the cow- a tradition or archaism. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, p. 1250- 1255, 2005.

HOPKINS, S. G.; DIGIACOMO, R. F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 107-128, 1997.

HUBER, N. L.; DIGIACOMO, R. F.; EVERMANN, J. F.; STUDER, E. Bovine leukemia virus infection in a large Holstein herd: prospective comparison of production and reproductive performance in antibody-negative and antibody-positive cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 9, p. 1477- 1481, 1981.

HUYNH M. L.; FADOK V. A.; HENSON P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, p. 41-50, 2002.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Recommended methods for somatic cell counting in milk. **Bulletin of the IDF**, v.168, n. 19, 1984.

ISAACSON, J. A.; FLAMING, K. P.; ROTH, J. A. Increased MHC class II and CD25 expression on lymphocytes in the absence of persistent lymphocytosis in cattle experimentally infected with bovine leukemia virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, p. 235-248, 1998.

ISLAS, A. L.; LÓPEZ, J. M.; MONTES, G. O.; BÓRQUEZ, F. S.; TORRES, C. S. Detección de anticuerpos antiviral de la leucosis enzoótica bovina en terneros de lechería alimentados con calostro de vacas seropositivas en los primeros meses de vida. **Avances en Ciencias Veterinarias**, v. 7, n. 1, p. 51-55, 1992.

JACOBS, R. M.; HEENEY, J. L.; GODKIN, M. A.; LESLIE, K. E.; TAYLOR, J. A.; DAVIES, C.; VALLI, V. E. O. Production and related variables in bovine leukaemia virus-infected cows. **Veterinary Research Communications**, v. 15, p. 463-474, 1991.

KACZMARCZYK, E.; BOJAROJÉ-NOSOWICZ, B.; FIEDOROWICZ, A. Leukocyte acid phosphatase and metabolic efficiency of phagocytes in the first lactation trimester of cows from a leukaemic herd. **Journal of Applied Genetic**. v.46, n.1, p. 59-67, 2005.

KAMPEM, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LARSEN, S.; ROTH, J. A.; FRANK, D. E.; LUND, A. Repeatability of flow cytometric and classical measurement of phagocytosis and respiratory burst in bovine polymorphonuclear leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, n. 1-2, p. 105-114, 2004a.

KAMPEM, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LUND, A. Flow cytometric measurement of neutrophil respiratory burst in whole bovine blood using live *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunological Methods**, v. 289, n. 1-2, p. 47-55, 2004b.

KEHRLI, M. E.; HARP, J. A. Immunity in the mammary gland. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 17, n. 3, 2001.

KELLY A.L.; TIERNAN D.; O'SULLIVAN C.; JOYCE P. Correlation between bovine milk somatic cell count and polymorphonuclear leukocyte level for samples of bulk milk and milk from individual cows, **Journal Dairy Science**. v.83, p. 300–304, 2000.

KETTMANN, R.; COUEZ, D.; D'GRÉGOIRE; BURNY, A. Leukemogenesis by bovine leukemia virus. In: BURNY, A.; MAMMERICKX, M. (Ed.). **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus**. Boston: Martinus Nijhoff, 1987. p. 153-160.

KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI, M. E.; HARP, J. A. Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 2, p. 315-319, 1999.

KOBAYASHI, S.D.; VOYICH, J.M.; SOMERVILLE, G.A.; BRAUGHTON, K.R.; MALECH, H.L.; MUSSER, J.M.; DELEO, F.R. An apoptosis-differentiation program in human polymorphonuclear leukocytes facilitates resolution of inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**. v.73, p. 315-322, 2003.

KOESS, C.; HAMANN, J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. **Journal of Dairy Research**, v. 75, p. 225-232, 2008.

KORHONEN, H.; MARNILA, P.; GILL, H.S.; Milk immunoglobulins and complement factors. **British Journal of Nutrition**. v. 84. n.1. p. S75-S80.2000.

KRAMER, J. W. Normal hematology of cattle. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. p. 1075-1084.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Willians & Wilkings, 1994. 1599 p.

LANGSTON, A.; FERDINAND, G. A.; RUPPANNER, R.; THEILEN, G. H.; DRLICA, S.; BEHYMER, B. S. Comparison of production variables of bovine leukemia virus antibody-negative and antibody-positive cows in 2 California dairy herds. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, p. 1093-1098, 1978.

LEE, J. W.; PAAPE, M. J.; ELSASSER, T. H.; ZHAO, X. Elevated milk soluble CD14 in bovine mammary glands challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 7, p. 2382-2389, 2003.

LEITNER, G.; SHOSHANI, E.; KRIFUCKS, O.; CHAFFNER, M.; SARANA, A. Milk leucocyte population patterns in bovine udder infections of different aetiology. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 47, p. 581-589, 2000.

LENNETTE, E. M.; BALOWS, A.; HANSLER JR, W. J. **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington: American Society of Microbiology, 1985. 254 p.

LEUZZI JUNIOR, L. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 211-221, 2001.

LETESSON, J.J.; VAN DEN BROECKE.; MARBAIX-CLEUTER, Y.; DELCOMMENNE, M.; MAGERA, A.; MAMMERICKX, M.; BURNY, A.; DEPELCHIM, A. FACS analysis of bovine leukemia virus (BLV) infected cell lines with monoclonal antibodies (mAbs) to B cells and to monocytes/macrophages. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 27, 1-3, p. 207-213, 1991,

LOSINGER, W. C. Evaluating the uncertainty in estimates of the economic impacts of Bovine-Leukosis virus in U.S. dairy cows. **Agricultural Economics**, v. 35, p. 363-372, 2006.

LUN, S.; ASTRÖM, G.; MAGNUSSON, U.; ÖSTENSSON, K. Total and differential leucocyte counts and lymphocyte subpopulations in lymph, afferent and efferent to the supramammary lymph node, during endotoxin-induced bovine mastitis. **Reproduction Domestic Animal**, v. 42, p. 126-134, 2007.

MATOS, P. F.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre os resultados do teste de ELISA e da imunodifusão em gel de ágar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, p. 171-179, 2005.

MEAS, S.; USUI, T.; OHASHI, K.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. **Veterinary Microbiology**. v. 84, n. 3, p. 275-282, 2002.

MEHRZAD, J.; DOSOGNE, H.; MEYER, E.; HEYNEMAN, R.; BURVENICH, C. Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 399-415, 2001.

MEHRZAD, J.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. Viability of milk neutrophils and severity of bovine coliform mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4150-4162, 2004.

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

MIRSKY, M. L.; OLMSTEAD, C. A.; DA, Y.; LEWIN, H. A. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. **Journal of Virology**, v. 70, n. 4, p. 2178-2183, 1996.

MOLLOY, J. B.; WALKER, P. J.; BALDOCK, F. C.; RODWELL, B. J.; COWLEY, J. A. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine leukaemia virus p24 antibody in cattle, **Journal of Virological Methods**. 28, p. 47-58, 1990.

MONFARDINI, E.; MERRIS, V. V.; PAAPE, M.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. L. Selectin and chemotaxis throughout bone marrow granulocyte maturation in the bovine. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3350-3357, 2004.

MOTTON, D. D.; BUEHRING, G. C. Bovine leukemia virus alters growth properties and casein synthesis in mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2826-2838, 2003.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**. 7. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. 365 p.

NAGY, D. W.; TYLER, J. W.; STOKER, A.; KLEIBOEKER, S. B. Association between the strength of serologic recognition of bovine leukosis virus and lymphocyte count in bovine leukosis virus- infected cows. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 11, p. 1681-1684, 2002.

NAIF, H.; BRANDON, R. B.; DANIEL, R. C. W.; LAVIN, M. F. Bovine leukemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 25, p. 117-129, 1990.

ÖSTENSSON, K.; HAGELTORN, M.; ASTRÖM, G. Differential cell counting in fraction-collected milk from dairy cows. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v. 29, p. 493-500, 1988.

OTT, S. L.; JOHNSON, R.; WELLS, S. J. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 61, p. 249-262, 2003.

PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D.; ZHAO, X.; LEE, J. W. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. **Veterinary Research**, v. 34, p. 597-627, 2003.

PAAPE, M. J.; LILIUS, E. M.; WIITANEN, P. A.; KONTIO, M. P.; MILLER, R. H. Intramammary defense against infections induced by *Escherichia coli* in cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 477-482, 1996.

PAAPE, M.; MEHRZAD, J.; ZHAO, X.; DETILLEUX, J.; BURVENICH, C. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 109-121, 2002.

PAAPE, M. J.; MILLER, R. H.; YOUNG, M. D.; PETERS, R. R. Influence of involution on intramammary phagocytic defense mechanisms. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1849-1856, 1992.

PAAPE, M. J.; WERGIN, W. P.; GUIDRY, A. J.; SCHULTZE, W. D. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 137, p. 555-578, 1981.

PARK, Y. H.; FOX, L. K.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 998-1006, 1992.

PARK, Y. H.; FOX, L. K.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C. Suppression of proliferative response of BoCD4⁺ T lymphocytes by activated BoCD8⁺ T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 36, p. 137-151, 1993.

PARODI, A. L. Pathology of enzootic bovine leukosis: comparison with the sporadic form. In: BURNY, A.; MAMMERICKX, M. (Ed.). **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus**. Boston: Martinus Nijhoff, 1987, p. 15-49.

PICCININI, R.; BRONZO, V.; MORONI, P.; LUZZAGO, C.; ZECCONI, A. Study on the relationship between milk immune factors and *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 501-510, 1999.

PIEPERS, S.; DE VliegHER, S.; DEMEYERE, K.; LAMRECHT, B. N.; KRUIF, A.; MEYER, E.; OPSOMER, G. Technical note: Flow cytometric identification of bovine milk neutrophils and simultaneous quantification of their viability. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 626-631, 2009.

PILLAI, S. R.; KUNZE, E.; SORDILLO, L. M.; JAYARAO, B. M. Application of differential inflammatory cell count as a tool to monitor udder health. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1413-1420, 2001.

POLITIS, I.; ZHAO, X.; MCBRIDE, B. W.; BURTON, J. H. Function of bovine mammary macrophages as antigen-presenting cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 30, n. 4, p. 399-410, 1992.

POLITIS, I.; ZHAO, X.; MCBRIDE, B. W.; BURTON, J. H. The effect of lipopolysaccharide on bovine mammary macrophage function. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 55, p. 220-223, 1991.

POLLARI, F. L.; WANGSUPHACHART, V. L.; DIGIACOMO, R. F.; EVERMANN, J. F. Effects of bovine leukemia virus infection on production and reproduction in dairy cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, 56, p. 289-295, 1992.

PRIN-MATHIEU, C.; ROUX, Y. L.; FAURE, G. C.; LAURENT, F.; BÉNÉ, M. C.; MOUSSAOUI, F. Enzymatic activities of bovine peripheral blood leukocytes and milk polymorphonuclear neutrophils during intramammary inflammation caused by lipopolysaccharide. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 4, p. 812-817, 2002.

RHODES, J. K.; PELZER, K. D.; JOHNSON, Y. J. Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 223, p. 346-352, 2001.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland. **Veterinary Research**, v. 37, p. 369-400, 2006.

REICHERT, M.; STEC, J. Simultaneous use of two primer pairs increases the efficiency of polymerase chain reaction assay in the diagnosis of bovine leukemia virus infection, **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** v. 11 , p. 543–547, 1999.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1077-1084, 2001.

RIVAS, A. L.; QUIMBY, F. W.; BLUE, J.; COKSAYGAN, O. Longitudinal evaluation of bovine mammary gland health status by somatic cell counting, flow cytometry, and cytology. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p. 399-407, 2001.

RIVAS, A. L.; TADEVOSYAN, R.; GOREWIT, R. C.; ANDERSON, K. L. LYMAN, R.; GONZÁLEZ, R. N. Relationships between the phagocytic ability of milk macrophages and polymorphonuclear cells and somatic cell counts in uninfected cows. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 70, p. 68-74, 2006.

RIVAS, A. L.; TADEVOSYAN, R.; QUIMBY, F. W.; COKSAYGAN, T.; LEIN, D. H. Identification of subpopulations of bovine mammary-gland phagocytes and evaluation of sensitivity and specificity of morphologic and functional indicators of bovine mastitis. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 165-172, 2002.

ROBERTS, D. H.; LUCAS, M. H.; WIMBERLEY, G. Detection of bovine leucosis virus in bronchoalveolar lung washing and nasal secretion. **The Veterinary Record**. v.111,n.22, p.501-3, 1982.

ROMERO, C. H.; CRUZ, G. B.; ROWE, C. A. Transmission of bovine leukemia virus through milk ingestion. **Revista de Microbiologia**, v. 14, n. 2, p. 109-114, 1983.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

RUSOV, C.; MILOJEVIC, Z.; STOJANOVIC, L. Occurrence of mastitis and sanitary-hygienic quality of milk of cows infected with enzootic leukosis. **Veterinarski Glasnik**, v. 48, p. 303-308, 1994.

RYSANEK, D.; SLADEK, Z.; BABAK, V.; VASICKOVA, D.; HUBACKOVA, M. Spontaneous and induced cytolysis of leukocytes from bovine mammary gland in the course of cultivation *in vitro* – the correlation with neutrophil granulocytes apoptosis. **Veterinarni Medicina**, v. 51, p. 265–277, 2006.

SANDEV, N.; KOLEVA, M.; BINEV, R.; ILIEVA, D. Influence of enzootic bovine virus upon the incidence of subclinical mastitis in cows at a different stage of infection. **Veterinarski Arhiv**, v. 74, n. 6, p. 411-416, 2004.

SAVILL, J.; DRANSFIELD, I.; GREGORY, C.; HASLETT, C. A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Reviews immunology*. v.2 (12), p. 965-975. 2002.

SCHALM, O. M.; NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis test. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, p. 199-204, 1957.

SCHEPERS, A.J.; LAM, T.J.G.M.; SCHUKKEN, Y.H.; WILMINK, J.B.M.; HANEKAMP, W.J.A. Estimation of Variance Components for Somatic Cell Counts to Determine Thresholds for Uninfected Quarters. **Journal of Dairy Science**, v. 80 n.8, p. 1833-1840, 1993.

SCHWARTZ, I.; BENSALD, A.; POLACK, B.; PERRIN, B.; BERTHELEMY, M.; LEVY, D. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. **Journal of Virology**, v. 68, n. 7, p. 4589-4596, 1994.

SCOTT, M.; POWELL, K.; KELLOGG, D.; MAUROMOUSTAKOS, M. Prevalence of subclinical mastitis in Holsteins infected with bovine leukemia virus (BLV), compared to uninfected cows. In: ANNUAL MEETING AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION, 86., 1991. Logan, Utah. **Book of abstract**. Logan, Utah: Utah State University, 1991. p. 202.

SIMARD, C.; RICHARDSON, S.; DIXON, P.; BÉLANGER, C.; MAXWELL, P. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leucosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian food inspection agency. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 64, p. 101-106, 2000.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D. Apoptosis of polymorphonuclear leukocytes of the juvenile bovine mammary glands during induced influx. **Veterinary Research**, v. 31, p. 553-563, 2000.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D. Apoptosis of resident and inflammatory macrophages before and during the inflammatory response of the virgin bovine mammary gland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 1-12, 2010.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D. Cell death and CD14 expression in resident and inflammatory polymorphonuclear leukocytes from virgin bovine mammary gland. **Research in Veterinary Science**, (Article in press), 2011.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D. Expression of macrophage CD44 receptor in the course of experimental inflammatory response of bovine mammary gland induced by lipopolysaccharide and muramyl dipeptide. **Research in Veterinary Science**, v. 86, p. 235-240, 2009.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D. The role of CD14 during resolution of experimentally induced *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, p. 243-262, 2006.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D. Ultrastructure of phagocytes from mammary glands of non-pregnant heifers. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 28, p. 291-297, 1999.

SLADEK, Z.; RYSANEK, D.; RYZNAROVA, H.; FALDYNA, M. Neutrophil apoptosis during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. **Veterinary Research**, v. 36, p. 629-643, 2005.

SLADEK, Z.; RYZNAROVA, H.; RYSANEK, D. Macrophages of the bovine heifer mammary gland: Morphological features during initiation and resolution of the inflammatory response. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 35, p. 116-124, 2006.

SLAMA, P.; SLADEK, Z.; RYSANEK, D.; LANGROVA, T. Effect of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* on apoptosis of bovine mammary gland lymphocytes. **Research Veterinary Science**, v. 87, p. 233-238, 2009.

SMITH, J. A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, p. 672-686, 1994.

SMITS, E.; BURVENICH, C.; GUIDRY, A. J.; HEYNEMAN, R.; LEËN, A. M. Diapedesis across mammary epithelium reduces phagocytic and oxidative burst of bovine neutrophils. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, p. 169-176, 1999.

SMITS, E.; BURVENICH, C.; HEYNEMAN, R. Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 3-4, p. 259-69, 1997.

SOHN, E. J.; PAAPE, M. J.; BANNERMAN, D. D.; CONNOR, E. E.; FETTERER, R. H.; PETERS, R. R. Shedding of sCD14 by bovine neutrophils following activation with bacterial lipopolysaccharide results in down-regulation of IL-8. **Veterinary Research**, v. 38, p. 95-108, 2007.

SOLTYS, J.; QUINN, M. T. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during *Staphylococcal* and *Streptococcal* mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. **Infection and Immunity**, v. 67, n.12, p. 6293-6302, 1999.

SORDILLO, L. M.; HICKS, C. R.; PIGHETTI, G. M. Altered interleukin-2 production by lymphocyte populations from bovine leukemia virus-infected cattle. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 207, p. 268-273, 1994.

SORDILLO, L.M.; SNIDER, M.; HUGHES, H.; AFSETH, G.; CAMPOS, M.; BABIUK, L.A. Pathological changes in bovine mammary glands following intramammary infusion of recombinant interleukin-2. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n.12, p. 4164-4174, 1991.

SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, 2002.

- SOUZA, F. N. **Avaliação do estresse oxidativo sob a resposta imune de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina**. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- SOUZA, G. N.; BRITO, J. R. F.; MOREIRA, E. C.; BRITO, M. A. V. P.; SILVA, M. V. G. B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1015-1020, 2009.
- SOUZA, M.; AZEVEDO, M. S.; JUNG, K.; CHEETHAM, S.; SAIF, L. J. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. **J. Virol.**, v. 82, n. 4, p. 1777-1786, 2008.
- STONE, D. M.; HOF, A. L.; DAVIS, W. C. Up-regulation of IL-2 receptor α and MHC class II expression on lymphocyte subpopulations from bovine leukemia virus infected lymphocytotic cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, p. 65-76, 1995.
- STONE, D. M.; NORTON, L. K.; CHAMBERS, J. C.; MEEK, W. J. CD4 T Lymphocyte activation in BLV-induced persistent B lymphocytosis in cattle. **Clinical Immunology**, v. 98, n.3, p. 280-288, 2000.
- TAYLOR, B. C.; DELLINGER, J. D.; CULLOR, J. S.; SCOTT, J. L. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. **Cellular Immunology**, v. 156, p. 245–253, 1994.
- TAYLOR, B. C.; KEEFE, R. G.; DELLINGER, J. D.; NAKAMURA, Y.; CULLOR, J. S.; STOTT, J. L. T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. **Cellular Immunology**, v. 182, p. 68-76, 1997.
- TAYLOR, B. C.; STOTT, J. L.; THURMOND, M. A.; PICANSO, J. P. Alteration in lymphocyte subpopulations in bovine leucosis virus-infected cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. V. 31, p. 35-47, 1992.
- TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J. A.; DOHOO, I. R.; KEEFE, G. P.; HADDAD, J. P.; TREMBLAY, R. Production effects of pathogens causing bovine leukosis, bovine viral diarrhea, paratuberculosis, and neosporosis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 659-669, 2007.
- TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J.A.; DOHOO, I.R.; STRYHN, H.; KEEFE, G.P.; HADDAD, J.P. Effects of seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum on culling in dairy cattle in four Canadian provinces. **Veterinary Microbiology**. v. 109. p. 147-158. 2005.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária** : uma Introdução 6. ed ,São Paulo, ed. Roca, 532 p. 2002.
- THORNBERRY, N.A. Caspases: key mediators of apoptosis. **Chemistry and Biology**. v.5(5), p. R97-R103. 1998.

- THURMOND, M. C.; CARTER, R. L.; PUHR, D. M.; BURRIDGE, M. J.; MILLER, J. M.; SCHMERR, M. J. F.; VAN DER MAATEN, M. J. An epidemiological study of natural *in utero* infection with Bovine Leukemia Virus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 47, p. 316-319, 1983.
- UNGAR-WARON, H.; PAZ, R.; BRENNER, J.; TRAININ, Z. Effect of permeabilization on peripheral blood lymphocytes of bovine leukemia virus (BLV)-infected cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, p. 339-343, 1997.
- VANGROENWEGHE, F.; RAINARD, P.; PAAPE, M.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. Increase of *Escherichia coli* inoculum doses induces faster innate immune response in primiparous cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4132-4144, 2004.
- VAN KAMPEN, C.; MALLARD, B. A.; WILKIE, B. N. Adhesion molecules and lymphocyte subsets in milk and blood of periparturient Holstein cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, p. 23-32, 1999.
- VAN OOSTVELDT, K.; TOMITA, G. M.; PAAPE, M. J.; CAPUCO, A. V.; BURVENICH, C. Apoptosis of bovine neutrophils during mastitis experimentally induced with *Escherichia coli* or endotoxin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 3, 2002.
- VAN OOSTVELDT, K.; VANGROENWEGHE, F.; DOSOGNE, H.; BURVENICH, C. Apoptosis and necrosis of blood and milk polymorphonuclear leukocytes in early and midlactating healthy cows. **Veterinary Research**, v. 32, p. 617-622, 2001.
- VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C.; Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 167-190, 2000.
- WERLING, D.; HOWARD, C. J.; NIEDERER, E.; STRAUB, O. C.; SALMULLER, A.; LANGHANS, W. Analysis of the phenotype and phagocytic activity of monocytes/macrophages from cattle infected with the bovine leukaemia virus. **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 62, p. 185-195, 1998.
- WERLING, D.; PIERCY, J.; COFFEY, T. J. Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells – potential role in pathogen discrimination? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 2-11, 2006.
- WERLING, D.; SILEGHEM, M.; LUTZ, H.; LANGHANS, W. Effect of bovine leukemia virus infection on bovine peripheral blood monocyte responsiveness to lipopolysaccharide stimulation in vitro. **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 48, p. 77-88, 1995.
- WU, D.; TAKAHASHI, K.; LIU, N.; KOGUCHI, A.; MAKARA, M.; SASAKI, J.; GORYO, M.; OKADA, K. Distribution of T-lymphocyte subpopulation in blood and spleen of normal cattle and cattle with Enzootic Bovine Leukosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, p. 117-127, 1999.
- YAGI, Y.; SHIONO, H.; SHIBAHARA, T.; CHIKAYAMA, Y.; NAKAMURA, I.; OHNUMA, A. Increase in apoptotic polymorphonuclear neutrophils in peripheral blood after intramammary infusion of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 89, p. 115-125, 2002.

YAMAGUCHI, T.; HIRATSUKA, M.; ASAI, K.; KAI, K.; KUMAGAI, K. Differential distribution of T lymphocyte subpopulations in the bovine mammary gland during lactation. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.1459, 1999.

ZHAO, X.; LACASSE, P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. **Journal of Animal Science**, n. 86, p. 57-65, 2008.