Fernando Nogueira de Souza

Avaliação do estresse oxidativo sob a resposta imune de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

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

São Paulo

2010

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2270
FMVZ

Souza, Fernando Nogueira de
Avaliação do estresse oxidativo sob a resposta imune de bovinos infectados
pelo vírus da leucose enzootica bovina / Fernando Nogueira de Souza. -- 2010.
83 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

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

1. Estresse oxidativo. 2. Glutathione peroxidase. 3. Superóxido dismutase.
4. Leucose enzootica bovina. 5. Bovinos I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do estresse oxidativo de bovinos infectados pelo vírus da Leucose Enzoótica bovina e seus efeitos na resposta imune", protocolado sob o nº1227/2007, utilizando 30 (trinta) bovinos, 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 21/11/07.

We certify that the Research "Evaluation of the oxidative stress of bovines infected with bovine leukemia virus and the effect on the immune response", protocol number 1227/2007, utilizing 30 (thirty) bovines, 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 11/21/07.

São Paulo, 22 de novembro de 2007

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOUZA, Fernando Nogueira

Título: Avaliação do estresse oxidativo sob a resposta imune de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

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

DEDICATÓRIA

À minha mãe - Helena Maria Nogueira Venâncio...

Sem dúvida não teria conquistado essa vitória sem a sua devoção, carinho, estímulo, apoio e a confiança que desprendeu por mim. Pessoa que com amor, não poupou sacrifícios para a execução deste trabalho. Meu eterno obrigado !!!

Ao meu avó, Francisco de Souza Fonseca (*in memoriam*), exemplo de vida, dignidade, retidão, sabedoria, dedicação, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, meu porto seguro, que me apóia incondicionalmente em cada passo desta minha caminhada, sempre acreditando no meu crescimento como ser humano e como profissional. Sem vocês nada disto teria sentido. Registro aqui minha eterna gratidão. Amo vocês !!

À minha querida orientadora e amiga, Prof^a. Dr^a. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, por me receber de braços abertos nesta nova casa e não poupar esforços para meu crescimento pessoal e profissional. Sou e serei sempre grato.

À Prof^a. Dr^a. Maria Claudia Araripe Sucupira, prestativa, conselheira, e sempre presente nos momentos mais alegres e mais difíceis desta jornada. Obrigado pela confiança em mim depositada. Além de me dado a honra de compartilhar seus ensinamentos, me dá a honra de tê-la como amiga.

Ao Prof. Dr. Magnus Ake Gidlund, do Laboratório de Imunofisiopatologia do Departamento de Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Referência, vanguarda e excelência é sua marca. Pessoa que me proporcionou preciosos ensinamentos e com o qual tive a grande honra de trabalhar. Sua visão crítica foi fundamental para o aprimoramento deste trabalho. Manifesto aqui meu profundo apreço.

Ao meu querido irmão Rodrigo Nogueira de Souza, e sua pequena família - Dênia Rocha e a pequena Ana Clara, que sempre estiveram ao meu lado com seus ombros amigos.

Aos meus tios Cherife da Silva e Maria de Sousa Oliveira e Silva, que me estenderam a mão no momento mais difícil, sua ajuda é impagável. Meus eternos agradecimentos.

Ao meu amigo Eduardo Milton Ramos Sanchez, que esteve ao meu lado em todos os momentos, com palavras e conselhos que me ajudaram a trilhar este caminho.

À Cláudia Regina Stricagnolo, técnica do Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, que participou ativamente na realização deste projeto, tornando-se uma grande amiga. Seus conselhos foram fundamentais neste caminho traçado. Receba meus sinceros agradecimentos pela dívida que tenho por você !!!

À Clara Satsuki Mori, técnica do Laboratório de Doenças Nutricionais e Metabólicas do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP. Sempre disposta a ajudar com competência e bom humor. Meus mais profundos e sinceros agradecimentos.

À Dr^a. Monica Sakai, do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, que me recebeu de braços abertos nesta “outra” nova casa. Pessoa maravilhosa que tive o prazer que ter cruzado em minha vida. Graças a seus ensinamentos e diligência, este trabalho pode ser executado. Meus sinceros e profundos agradecimentos.

À Andréia Oliveira Latorre, pós-graduanda do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, sempre presente nesta etapa de minha vida. Pessoa com afinco, dedicação e brilhantismo. Sem sua ajuda, com certeza este caminho seria muito mais árduo. Minha maior alegria é saber que sempre poderei contar sua amizade. Muito Obrigado !!!

À Karin Kieling, do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, sempre sorridente e de bom humor. Seu altruísmo e dedicação, e sua constante busca pela perfeição me servirão de exemplo pelo resto da minha vida. Meus eternos agradecimentos !!!

À Dr^a. Cristina Oliveira Massoco, por seus preciosos ensinamentos e competência, sou e serei sempre grato.

Ao Prof. Dr. Francisco Martins Figueiredo Neto, do Grupo de Fluidos Complexos do Instituto de Física da USP, por compartilhar seu conhecimento e possibilitar o aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. Fernando Wittwer, do Instituto de *Ciencias Clinicas Veterinarias* da *Universidad Austral de Chile*, um mestre de inigualável sabedoria. Obrigado por compartilhar valiosos ensinamentos !!!

Ao Dr. Max J. Paape, do Laboratório *Bovine Functional Genomics* pertecente ao *United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service*, pela experiência compartilhada.

À Prof^a. Dr^a. Cynthia Baldwin, do *Department of Veterinary and Animal Science* da *University of Massachusetts*, pela prontidão e vasta experiência compartilhada.

Ao Dr. Carlos Concha, do *Department of Antibiotics* do *National Veterinary Institute – Uppsala- Suécia*, pela ajuda desprendida e pelos ensinamentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. Gary Splittler e Dr. Diogo Magnani, da *University of Wiscosin - Madison*, pelos ensinamentos compartilhados.

À Dr^a. Gerlândia Neres Pontes, do Instituto da Criança da Faculdade de Medicina da USP, pelos seus valiosos ensinamentos. Sempre disposta a ajudar da melhor maneira possível. Obrigado !!!

Aos Prof. Dr. João Palermo Neto e Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa Pinto, do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, por disponibilizarem a utilização do laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP.

Aos Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara e Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes, do Departamento de Imunologia do Instituto de Biociências da USP, por disponibilizarem a utilização do citômetro de fluxo do Departamento de Imunologia do Instituto de Biociências da USP.

À Dr^a. Hiro Goto, do Instituto de Medicina Tropical da USP, por disponibilizar a utilização do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do IMT-USP.

Ao Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências da USP, por fornecer a cepa de *Escherichia coli* utilizada no presente estudo.

À Prof^a. Dr^a. Eliana Reiko Matushima, do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, por fornecer a cepa de *Staphylococcus aureus* utilizada no presente estudo.

Ao Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, do Departamento de Produção e Nutrição Animal da FMVZ-USP, por proporcionar e viabilizar os animais utilizados no presente estudo.

À Andréia Moreira Monteiro, pós-graduanda do Laboratório de Imunofisiopatologia do Departamento de Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pelo companheirismo, e tempo despendido em me auxiliar nas análises.

À equipe “Della Libera” formada pelos médicos veterinários Bárbara Gabriela Soares Sanches, Bruna Parapinski dos Santos, Camila Freitas Batista, Camila Silano, Cláudia Pestana Ribeiro, Giancarlo Bonagura, Glauco Dente Gurtler, Kátia Antunes Souza, Luciana Oliveira Parra Dias, Maiara Garcia Blagitz, Melissa Hartman, Milton Ricardo Azedo e Tatiana Rezende Spinola. Pessoas de natureza tão diferentes e ao mesmo tempo tão dedicadas. Este fruto é resultado do esforço e dedicação de cada um de vocês. Meus mais sinceros agradecimentos !!!

À família “Sucupira”, em especial, às médicas veterinárias: Aline Alberti Morgado, Cecília de Faria Brito Augusto, Giovanna Rocha Nunes e Rebeca Alves Weigel. Pessoas maravilhosas que me receberam de braços abertos nesta nova casa. O carinho que desprezo por vocês, levarei para sempre comigo. Meus mais profundos agradecimentos !!!

Aos demais pós-graduandos do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, em especial, Alessandra Silva Lima, Aline Santana da Hora, Andrea Cristina Parra, Antônio Humberto Hamad Minervino, Bruno Marques Teixeira, Camila Domingues de Oliveira, Carolina Akiko Sato Cabral de Araújo, Cynthia Cristina Venâncio, Daniela Passarelli, Daniele Yuri Massukado R. Silva, Elizabeth Bohland, Fernanda Cavallini Cyrillo, Frederico Augusto Mazzocca Lopes Rodrigues, Enoch Brandão de Meira Souza Junior, Laura Cristina Henriques, Marjorie Yumi Hasegawa, Priscilla Marques do Nascimento, Raquel Fraga e Silva Raimundo, Thales dos Anjos de Faria Vechiato e Vanessa Storillo pelo apoio e agradável convivência.

Aos pós-graduandos do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, em especial, Beatriz Dorr Carniceiro, Viviane Ferraz de Paula, Camila Bento de Lima e Samantha Ive Miyashiro pela troca de informações e experiências, e suas afáveis companhias. Muito Obrigado !!!

Aos pós-graduandos do Instituto de Medicina Tropical da USP, em especial, Juliana Ide Aoki e Luiza de Campos Reis, e às Dr^a. Maria das Graças Prianti e Dr^a. Sandra Regina Castro Soares por compartilhar experiências e informações, e pela agradável convivência.

Ao pós-graduando Otávio Cabral Marques, do Laboratório de Imunologia Humana do Departamento de Imunologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela ajuda desprendida.

Aos amigos Rodrigo Azevedo Rodrigues e Ermelindo Della Libera Júnior, da Disciplina de Gastroenterologia da Escola Paulista de Medicina da UNIFESP, pela confiança depositada e pelo companheirismo.

Aos amigos, Dr. Gustavo Henrique Ribeiro Viana e Renato Márcio Ribeiro Viana, pelo apoio deste o início desta jornada, a semente que me rendeu este fruto. Suas amizades, guardarei para sempre no meu coração.

À Silvana Aparecida da Silva, técnica do Laboratório de Imunofisiopatologia do Departamento de Imunologia do ICB-USP, pela agradável convivência. Pessoa, que com alegria e bom humor, sempre disposta a ajudar da melhor maneira possível.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, em especial, Adelaide Borges, Marly Elizabete Ferreira de Castro, Carmen Silva Ribeiro, Edna Santana dos Santos, Maria Luisa Franchini, Maria Helena da Silva Pelissari, Maria Aparecida de Freitas, e Silvana Rossi Guedes. Pela convivência e colaboração, eu agradeço.

Aos funcionários do laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, pelo apoio e sadia convivência.

Aos funcionários da biblioteca “Virginie Buff D’Ápice”, sem exceção, sempre dispostos a ajudar da melhor maneira possível.

Aos funcionários e residentes do Hospital de Ruminantes da FMVZ-USP, pela ajuda desprendida e pela agradável convivência.

À Escola de Veterinária da UFMG, berço de minha formação. O conhecimento adquirido e compartilhado nesta etapa de minha vida foi e sempre será imprescindível para meu aprimoramento profissional e crescimento como ser humano.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela concessão da bolsa (auxílio 07/56611-7).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – pela concessão do auxílio à pesquisa que possibilitou a execução do presente estudo (projeto 07/56069-8).

Aos animais, involuntariamente envolvidos nesta pesquisa, sem os quais tal esforço não se fez em vão.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo

“Quanto mais aprendemos sobre o mundo, quanto mais profundo nosso conhecimento, mais específico, consistente e articulado será nosso conhecimento do que ignoramos – o conhecimento da nossa ignorância. Essa, com efeito, é a principal fonte da nossa ignorância: o fato de que nosso conhecimento só pode ser finito, mas nossa ignorância deve ser necessariamente infinita. [...] Vale a pena lembrar que, embora haja uma vasta diferença entre nós no que diz respeito aos fragmentos que conhecemos, somos todos iguais no infinito da nossa ignorância”

Karl Popper (1961)

“A principal descoberta deste século de pesquisa e de ciência é, provavelmente, a profundidade de nossa ignorância da natureza. Quanto mais aprendemos, mais percebemos a extensão dessa ignorância. Isso é em si uma grande novidade. Uma novidade que teria espantado nossos avôs dos séculos XVIII e XIX. Pela primeira vez, fingimos compreender como funcionam as coisas. Ou simplesmente contamos histórias para tapar buracos. Agora que começamos a estudar seriamente a natureza, começamos a perceber a amplidão das perguntas; a medir a distância a ser percorrida para tentar respondê-las. O grande perigo para a humanidade não é desenvolver o conhecimento. É a ignorância.”

François Jacob (1997)

“A mente que se abre para uma ideia jamais volta ao seu tamanho original”

Albert Einstein

“Viver no mundo sem tomar consciência do significado do mundo é como vagar por uma
imensa biblioteca sem tocar os livros”

Os Ensinaamentos Secretos de Todos os Tempos

Dan Brown (2009)

RESUMO

SOUZA, F. N. **Avaliação do estresse oxidativo sob a resposta imune de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina.** [Evaluation of oxidative stress on the immune response of bovine leukemia virus-infected dairy cows]. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Foi demonstrado o envolvimento das espécies reativas de oxigênio (ERO) na patogênese de algumas retrovíroses, levando muitas vezes à progressão e/ou persistência das mesmas. No entanto, o papel das espécies reativas de oxigênio resultante da modulação do sistema antioxidante, e seu envolvimento na infecção de bovinos naturalmente infectados pelo VLEB, até o presente trabalho, não tinha sido ainda investigado. Desta forma, o presente estudo objetivou-se avaliar o envolvimento do estresse oxidativo na infecção pelo VLEB em bovinos naturalmente infectados, associado ou não ao estabelecimento da linfocitose persistente (LP). Assim, a avaliação do estresse oxidativo se deu pelo teor de malondialdeído, concentração de glutathiona reduzida, atividade da glutathiona peroxidase e da superóxido dismutase, e pela atividade antioxidante total; e a resposta imune pela quantificação das subpopulações de linfócitos, função fagocítica e produção intracelular de peróxido de hidrogênio de leucócitos polimorfonucleares, morte celular e proliferação linfocitária, além da avaliação hematológica e sorodiagnóstico da leucose enzoótica bovina (LEB). Os resultados do presente estudo apontaram para o envolvimento do estresse oxidativo na infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina, dado pela menor concentração de glutathiona peroxidase e a tendência a menor atividade da superóxido dismutase eritrocitárias nos animais infectados pelo VLEB, não podendo, contudo, ser associado à fase da infecção. Ademais, os marcadores de estresse oxidativo não apresentaram alterados nem sequer a atividade antioxidante total destes animais. Além disso, o presente trabalho apontou para menor proliferação de linfócitos e redução da apoptose de células CD5⁺ nos animais infectados pelo VLEB manifestando LP, corroborados pelo significativo aumento da população de linfócitos B (CD21⁺), e dos principais co-marcadores das células infectadas, no caso células CD5⁺ e CD11b⁺, nestes animais. No entanto, não observou diferenças significativas na população de linfócitos T destes animais, nem sequer alteração da capacidade fagocítica e produção intracelular de peróxido de hidrogênio pela população de leucócitos polimorfonucleares nos animais infectados.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Glutathione peroxidase. Superóxido dismutase. Leucose enzoótica bovina. Bovinos.

ABSTRACT

SOUZA, F. N. **Evaluation of oxidative stress on the immune response of bovine leukemia virus-infected dairy cows.** [Avaliação do estresse oxidativo sob a resposta imune de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina]. 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Abundant observations of multiple pathogenic interactions between reactive oxygen species (ROS) and the pathogenesis of some retroviruses have drawn attention to role of ROS on disease progression and/or persistence of infection. Therefore, the role of the oxidative stress resulted from the modulation of the antioxidant system in dairy cows naturally infected with BLV has not been studied yet. So, the present study tries to investigate the involvement of oxidative stress in dairy cows naturally infected with BLV associated or not with the persistent lymphocytosis (PL). Thus, the oxidative stress was evaluated by the malondialdehyde, reduced glutathione content, and by the activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase, and also total antioxidant activity. The immune response was also evaluated by the quantification of lymphocyte subsets, lymphocyte proliferation, polymorfonuclear leukocytes phagocytosis and intracellular hydrogen peroxide production, and cell death. The results of the present work point out to an involvement of oxidative stress in dairy cows naturally infected with BLV, given by a lower glutathione peroxidase activity and also a tendency towards lower superoxide dismutase activity, but it can be not associated with PL. Furthermore, the oxidative stress markers and also the total antioxidant status was not altered in infected animals. The present study also showed a lower lymphocyte proliferation and apoptosis rates of CD5⁺ cells, strengthen by a higher B cells (CD21⁺) counts and also by a significant augment of CD5⁺ and CD11b⁺ positive cells that are often co-expressed by the infected cells. Although, no significant difference was observed in T cells counts. Moreover, the phagocytosis rates and the intracellular hydrogen peroxide production by the polymorphonuclear leukocytes are not altered in BLV infected dairy cows.

Key words: Oxidative stress. Glutathione peroxidase. Superoxide dismutase. Bovine leukemia virus. Bovine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO NAS INFECÇÕES RETROVIRAIS	22
2.2	EFICÁCIA DA TERAPIA ANTIOXIDANTE SOB AS INFECÇÕES RETROVIRAIS	24
3	OBJETIVOS GERAIS	27
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27

Capítulo 1. Atividade antioxidante e marcadores biológicos de estresse oxidativo em bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina	28
---	-----------

4	INTRODUÇÃO	29
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1.1	Animais e delineamento experimental	30
4.1.2	Análise hematológica	31
4.1.3	Sorodiagnóstico	31
4.1.4	Quantificação de linfócitos B por citometria de fluxo	31
4.1.5	Concentração de hemoglobina	32
4.1.6	Atividade da glutathiona peroxidase	33
4.1.6	Atividade da superóxido dismutase	33
4.1.8	Atividade antioxidante total	33
4.1.9	Índice de peroxidação lipídica avaliado pelo teor de malondialdeído	34
4.1.10	Determinação da glutathiona reduzida	34
4.1.10	Análise estatística	35
4.2	RESULTADOS	35
4.2.1	Análise hematológica e sorodiagnóstico da LEB	35
4.2.2	Quantificação de linfócitos B e sua correlação com GSH-Px e SOD	37
4.2.3	Atividade da GSH-Px e SOD	37
4.2.4	Atividade antioxidante total	38

4.2.5	Concentração de Malondialdeído e Glutathione reduzida	38
4.3	DISCUSSÃO	40

Capítulo 2. Avaliação funcional de leucócitos polimorfonucleares de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina	43
---	-----------

5	INTRODUÇÃO	44
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
5.1.1	Animais e delineamento experimental.....	44
5.1.2	Análise hematológica.....	45
5.1.3	Sorodiagnóstico.....	45
5.1.4	Conjugação de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> ao iodeto de propídio	45
5.1.5	Avaliação da função fagocítica e da produção intracelular de peróxido de hidrogênio.....	47
5.1.6	Análise estatística.....	49
5.2	RESULTADOS	49
5.2.1	Análise hematológica e sorodiagnóstico da LEB	49
5.2.2	Função fagocítica e produção intracelular de peróxido de hidrogênio	49
5.3	DISCUSSÃO	51

Capítulo 3. Proliferação e apoptose de linfócitos de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina	53
--	-----------

6	INTRODUÇÃO	54
6.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
6.1.1	Animais e delineamento experimental.....	54
6.1.2	Análise hematológica.....	55
6.1.3	Sorodiagnóstico.....	55
6.1.4	Isolamento de células mononucleares do sangue periférico	55
6.1.5	Proliferação de linfócitos	56
6.1.6	Apoptose	57
6.1.7	Identificação de células CD5 ⁺	58
6.1.8	Análise estatística.....	58

6.2	RESULTADOS	59
6.2.1	Análise hematológica e sorodiagnóstico da LEB	59
6.2.2	Proliferação de linfócitos	59
6.2.3	Apoptose de células CD5 ⁺	60
6.3	DISCUSSÃO	61

Capítulo 4. Quantificação da população de células B e das subpopulações de linfócitos T em bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina.....	63
--	-----------

7	INTRODUÇÃO	64
7.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
7.1.1	Animais empregados	65
7.1.2	Análise hematológica	65
7.1.3	Sorodiagnóstico	65
7.1.4	Isolamento de células mononucleares do sangue periférico	66
7.1.5	Citometria de Fluxo	66
7.1.6	Quantificação das subpopulações de linfócitos	67
7.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
7.3	RESULTADOS	69
7.3.1	Análise hematológica e sorodiagnóstico da LEB	69
7.3.2	Fenotipagem de linfócitos do sangue periférico	69
7.4	DISCUSSÃO	71
8	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

O vírus da leucose enzoótica bovina (VLEB), um deltaretrovírus tipo C, é incriminado como o agente etiológico da enfermidade conhecida como leucose enzoótica bovina (LEB), tendo ainda significativa homologia com o vírus T linfotrópico de primatas (de humanos: HTLV tipos 1, 2, 3 e 4 – e de símios – 1,2,3 e 5) (SAGATA et al., 1985; GILLET et al., 2007; MATSUOKA; JEANG.; 2007; SWITZER et al., 2009). Atualmente, o VLEB apresenta alta prevalência em várias regiões do mundo, apesar de ter sido erradicado com sucesso de algumas regiões da Europa. O VLEB pode estabelecer a persistência da infecção na subpopulação de linfócitos B, estando desta forma associado ao desenvolvimento de linfocitose persistente (LP), caracterizado pelo aumento permanente no número de linfócitos B, e linfossarcomas (GILLET et al., 2007).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO NAS INFECÇÕES RETROVIRAIS

Atualmente, o estresse oxidativo é definido como a alteração na sinalização e controle redox (JONES, 2006). Várias observações de múltiplas interações entre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) e algumas infecções têm atraído a atenção do papel destas interações na patogênese de várias enfermidades como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, doenças auto-imunes, neurodegenerativas e infecciosas, e até mesmo doenças causadas por príons (ONODERA et al., 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Neste contexto, o conhecimento dos mecanismos das células do hospedeiro que controlam a expressão viral é bastante restrito. A infecção pelo VLEB é caracterizada por período de latência associado à expressão viral menos significativa. Vários estudos demonstram a importante participação das espécies reativas de oxigênio (ERO) como intermediários de várias vias de sinalização celular (THANNICKAL; FANBURG, 2000; HANCOCK et al., 2001). É bem documentado o envolvimento das ERO na regulação e expressão de genes (ALLEN; TRESINI, 2000), em particular, tem sido demonstrado que as ERO facilitariam a expressão de vários genes virais, incluindo como exemplo outras retrovíroses como o vírus da imunodeficiência humana (VIH) e o HTLV-1, e doenças virais que também ocasionam aumento na população de linfócitos B como o vírus do Epstein-Barr (LEGRAND-POELS et al., 1990; LOS et al., 1998; AKAIKE, 2001; AQUARO et al., 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; LASSOUED et al., 2008; PYO et al., 2008).

Este efeito das ERO parece ser pelo menos em parte, devido à ativação do fator nuclear κ B (NF κ B). Têm sido também demonstrado o envolvimento do NF κ B na mediação do ionóforo de cálcio que aumenta a expressão viral do VLEB (BONDZIO et al., 2001), sendo reportado que o aumento do cálcio intracelular ocasiona a formação de ERO (BRÉCHARD; TSHIRHART, 2008). Adicionalmente a isto, estudos que utilizaram antioxidantes como a N-acetil-L-cisteína (NAC) indicam o envolvimento indireto das ERO na regulação da expressão do VLEB (BONDZIO et al., 2003). Corrobora a isso, achados que demonstraram o envolvimento da glutatona na proteção contra a apoptose na LEB,

associados aos estudos que apontam a importância da apoptose no desenvolvimento da linfocitose persistente (ALCARAZ et al., 2004).

É bem documentada a participação do estresse oxidativo em outras retrovírus. Deste modo, alguns estudos demonstraram que H_2O_2 pode levar a ativação da expressão do VIH-1 (LESGRAND-POELS et al., 1990; AQUARO et al., 2007; PYO et al., 2008). É também reportado que H_2O_2 induz a ativação da cadeia repetitiva terminal do VIH que pode explicar o explosivo aumento da replicação viral no estágio intermediário da infecção, quando o estresse oxidativo ocorre. A indução do estresse oxidativo pode promover subsequente maior geração de ERO, e eventualmente resultar na progressão da doença, ocasionando prejuízos ao sistema imune (DRÖGE; HOLM, 1997; PYO et al., 2008).

Deve-se salientar ainda que Cho et al. (2008), demonstraram que animais Nrf2^{-/-} infectados pelo vírus respiratório sincicial humano (RSV) apresentaram resposta humoral (Th2), enquanto os animais Nrf2^{+/+} infectados pelo RSV apresentaram resposta celular (Th1) típica. Isto é importante, pois a resposta Th1 pode contribuir para a eliminação da infecção, enquanto a resposta Th2 pode mediar a replicação viral e a progressão da doença, sendo sugerido que a proporção entre glutatona reduzida/glutatona oxidada pode determinar o padrão de resposta Th1 e Th2 (CHO et al., 2008). Ademais, animais selênio-deficientes infectados apresentam aumento dos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e redução dos níveis de IL-2 e interferon- γ (INF- γ) comparados com os animais com níveis adequados de selênio, o que sugere mudança da resposta Th1 para Th2 (BECK, 2007).

É descrita a alteração da Th1 para Th2 em animais infectados pelo VLEB manifestando LP, o que reforça a idéia da possibilidade do envolvimento das ERO com a progressão da enfermidade, e o desenvolvimento da LP (PYEON et al., 1996; YAKOBSON et al., 2000).

Têm sido referida homologia entre certas proteínas virais e a glutatona peroxidase (TAYLOR et al., 1997) como descrito para o HTLV-1. Tais proteínas apresentam papel relevante na patogênese de enfermidades virais, como exemplo o HTLV-1 e o VIH-1, que protege as células infectadas do processo apoptótico, associado à progressão da doença (ZHAO et al., 2000; COHEN et al., 2004; CLARKE; TYLER, 2009). Sabe-se que o processo apoptótico é incriminado pelo desenvolvimento da linfocitose persistente em animais infectados pelo VLEB (DEBACQ et al., 2003; GILLET et al., 2007; FLORINS et al., 2008; BOUZAR et al., 2009).

Enfatiza-se ainda, que os linfócitos são circundados por fagócitos que liberam ERO, e que fontes de ERO como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH

oxidase) e a 5'lipooxigenase estão presentes nos linfócitos B (BONIZZII et al., 1999). Isto apresenta extrema relevância ao considerar que o VLEB apresenta tropismo pelas células B (SCHWARTZ et al., 1994).

Neste contexto, sabe-se que a indução da ativação de fagócitos pelo VIH está associada com o estresse oxidativo, não apenas pelo fato da liberação de ERO pelos fagócitos, mas também pela liberação de citocinas pró-inflamatórias liberadas por estes como o fator de necrose tumoral- α (FNT- α) e interleucina-1 (IL-1) (SCHWARZ, 1996). O FNT- α pode atuar na mitocôndria celular produzindo efeito pró-oxidante como a inibição do segundo sítio respiratório mitocondrial, o sítio de produção de superóxido (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1992). O FNT- α também atua na liberação do NF- κ B da proteína citoplásmica inibidora I κ B (SCHRECK et al., 1991). Após a liberação do NF- κ B, ocorre a translocação do NF- κ B para o núcleo onde o fator de transcrição liga ao ácido desoxiribonucleico (ADN), induzindo a transcrição de vários genes relacionados à resposta celular e viral.

Por outro lado, pacientes infectados pelo VIH apresentam considerável catabolismo de cisteína em tecidos musculares que drenam grande quantidade de glutathiona, que não é revertida com a terapia antiretroviral altamente efetiva (HAART) (BREITKREUTZ et al., 2000). No entanto, a suplementação *in vitro* de glutathiona ocasiona aumento da proliferação de linfócitos T e suprime a liberação do FNT- α em células mononucleares do sangue periférico de pacientes infectados pelo VIH recebendo a HAART (MULLER et al., 2000). Além disso, várias funções imunológicas têm sido atribuídas a glutathiona (DRÖGE et al., 1994; DRÖGE; HOLM, 1997).

2.2 EFICÁCIA DA TERAPIA ANTIOXIDANTE SOB AS INFECÇÕES RETROVIRAIS

O estresse oxidativo pode modular o sistema immune, e portanto os micronutrientes são essenciais para o adequado funcionamento do sistema imune, já que a capacidade antioxidante é influenciada pela ingestão de certos micronutrientes necessários para a atividade de importantes enzimas antioxidantes (DRAIN et al., 2007).

Sabe-se que a deficiência de micronutrientes é comumente observada em pacientes infectados pelo VIH em estágios avançados da doença, e ainda associado ao maior risco de progressão da doença e mortalidade (DRAIN et al., 2007). Não é surpresa que no início da

epidemia do VIH, pesquisadores começaram a notificar anormalidades no conteúdo de micronutrientes (LANZILLOTTI; TANG, 2005).

A NAC é convertida em metabólitos capazes de estimular a síntese de glutaiona. Estudos demonstraram que a suplementação inibe a replicação viral do VIH (ROEDERER et al., 1990; KALEBIC et al., 1991) e do VLEB (BONDZIO et al., 2003). Pacientes que receberam NAC apresentaram maior tempo de sobrevivência que o grupo controle (TOWNSEND et al., 2003). De fato, a NAC tem sido amplamente utilizada em pacientes infectados nos Estados Unidos e Europa ocidental (DRÖGE et al., 2000).

A dieta com baixo conteúdo de selênio tem sido correlacionada com aumento de 20 vezes no desenvolvimento da síndrome da deficiência humana (SIDA) em indivíduos infectados pelo VIH (BAUM et al., 1997). Consistentemente, pacientes infectados pelo VIH apresentam redução do conteúdo de selênio (Se) (DWORKIN et al., 1988; DWORKIN et al., 1994; LEI et al., 2007; STEPHENSEN et al., 2007) e da atividade glutatona peroxidase (GSH-Px) (DWORKIN et al., 1988; DWORKIN et al., 1994; LEI et al., 2007). A suplementação de Se tem sido associada ao aumento da atividade da GSH-Px (DELMAS-BEAUVIEX et al., 1996) e da necessidade de hospitalização (MULLER et al., 2000). Ademais, o baixo conteúdo de Se em mulheres tem sido associado com o aumento de três vezes na eliminação do VIH pela mucosa genital, sugerindo aumento da transmissão sexual (BAETEN et al., 2001). Balnsky e Argirova (1981) demonstraram depressão da atividade *in vitro* da transcriptase reversa do VLEB pela suplementação com selenito de sódio, importante fonte de Se.

Têm sido propostos que mecanismos virais que são utilizados para evadir os mecanismos de defesa do hospedeiro, como por exemplo, a inibição da apoptose de células infectadas. Alguns vírus utilizam proteínas antioxidantes específicas que eliminam metabólitos das ERO, protegendo as células dos danos induzidos por peróxidos, como tem sido proposto para o VIH (SHISLER et al., 1998; FADDEN, 1998; COHEN et al., 2004).

No entanto, dado os múltiplos efeitos pró- e antioxidantes observados *in vivo* e *in vitro* durante as infecções virais, assim como a habilidade dos antioxidantes de penetrar pelas membranas celulares para o interior celular, surpreende que esforços para incorporar antioxidantes na terapia de várias infecções virais nem sempre representam sucesso (SCHWARZ, 1996). Ademais, a interpretação da concentração sérica de micronutrientes torna-se complexa, já que os elementos traços e as vitaminas podem mudar de compartimentos biológicos durante a infecção aguda (LANZILLOTTI; TANG, 2005). Além disso, têm sido relatado que a administração de NAC com o intuito de aumentar o conteúdo

de glutathione nem sempre confere benefícios clínicos tão evidentes (TREITINGER et al., 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), nem a administração de coquetéis de antioxidantes. Enfatiza-se ainda que altas doses de vitamina E (α -tocoferol) podem ser contra indicadas podendo agir como pró-oxidantes em certas circunstâncias, e ainda afetar o metabolismo de drogas antiretrovirais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Alguns estudos relataram que antioxidantes podem se tornar pró-oxidantes em algumas condições (JONES, 2006).

Pelo supra-descrito, fica clara a importância do estresse oxidativo e suas diferentes vias que tangeiam o sistema imune. Soma-se ao fato, que apesar de insuficientemente descrita, a patogenia da leucose enzoótica bovina provavelmente apresenta alterações específicas em funções que também tendem ao estresse oxidativo, como já descrito em doenças similares. Assim, essa hipótese merece ser investigada não apenas para a melhor compreensão da doença, mas também por que isso pode representar variações na susceptibilidade a outras doenças, ou mesmo apontar para a necessidade de estabelecimento de protocolos antioxidantes específicos para estes indivíduos.

3 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo objetivou investigar possíveis alterações no sistema imune de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina e o envolvimento das espécies reativas de oxigênio na patogênese do complexo da leucose enzoótica bovina.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a infecção pelo VLEB em bovinos naturalmente infectados está associado com os marcadores biológicos de estresse oxidativo e com a proteção pelo sistema antioxidante.
- Avaliar a função fagocítica e a produção intracelular de peróxido de hidrogênio de leucócitos polimorfonucleares de bovinos naturalmente infectados pelo VLEB.
- Avaliar a proliferação de linfócitos e o processo apoptótico de células CD5⁺ em vacas holandesas em lactação infectadas pelo VLEB.
- Investigar a frequência e a contagem absoluta de linfócitos B e das subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo em bovinos infectados pelo VLEB com distintos perfis leucocitários conhecidos como alinfocitóticos (AL) e manifestando LP.

Capítulo 1. Atividade antioxidante e marcadores biológicos de estresse oxidativo em bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina

4 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre a produção de ERO e a capacidade do sistema antioxidante, que é responsável por eliminar tais oxidantes evitando a interação com os alvos celulares (BOUZAR et al., 2009). Vários estudos apontam para múltiplas interações entre as espécies reativas de oxigênio e algumas infecções demonstrando papel importante das ERO na patogênese de várias enfermidades incluindo as doenças virais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Conserrente a isso, algumas evidências indicam que as ERO podem influenciar a expressão do VLEB em linhagem de células B infectadas (BONDZIO et al., 2001; BONDZIO et al., 2003) e na modulação do processo apoptótico em linfócitos B de ovinos experimentalmente infectados (BOUZAR et al., 2009). Ademais, Alcaraz et al. (2004) demonstraram o envolvimento do sistema glutathione na inibição da apoptose em ovinos infectados pelo VLEB. Foi também relatado a indução da expressão do VLEB pela ativação da proteína quinase C (PKC) pela incubação de células mononucleares do sangue periférico de bovinos naturalmente infectados pelo VLEB manifestando linfocitose persistente (JENSEN et al., 1992).

Neste contexto, o controle do processo oxidativo pelo sistema antioxidante pode se apresentar como ferramenta de controle de várias enfermidades, entre elas a leucose enzoótica bovina (LEB). Desta maneira, estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas para incorporar antioxidantes no controle de infecções virais (SCHWARZ, 1996). Com isto em mente, Balansky e Arginova (1981) demonstraram a inibição do ácido ribonucleico-dependente e atividade da ADN-polimerase do VLEB pela suplementação com selenito de sódio. Sabe-se que o efeito biológico do selênio é principalmente devido à incorporação em selenoproteínas, como a glutathione peroxidase e a tireoredoxina (TRX), enzimas que participam de importantes sistemas de defesa antioxidantes (RAYMAN, 2000). No entanto, pouco se sabe do envolvimento do estresse oxidativo na infecção pelo VLEB.

Neste escopo, o presente estudo buscou determinar se a infecção pelo VLEB em bovinos naturalmente infectados está associado com os marcadores biológicos de estresse oxidativo e com a proteção pelo sistema antioxidante.

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Animais e delineamento experimental

Foram coletadas amostras sanguíneas de 100 fêmeas bovinas adultas da raça holandesa, oriundas de rebanhos destinados à produção de leite localizado no Estado de São Paulo. Dentre estes animais, foram selecionados 15 animais sem alterações clínicas evidentes, subdivididos uniformemente conforme o resultado do sorodiagnóstico e do leucograma em três grupos. Além disso, no objetivo de manter a homogeneidade amostral, buscou-se a inclusão de animais na mesma fase da lactação e lote de alimentação, divididos uniformemente nos seus devidos grupos. Um grupo foi composto de animais com sorodiagnóstico negativo, outro grupo continha animais com sorodiagnóstico positivo e alinfocitóticos, ambos sem alterações hematológicas conforme critérios estabelecidos para a espécie (Quadros 1 e 2), e o terceiro grupo formado por animais com sorodiagnóstico positivo apresentando LP. A persistência da linfocitose dos animais utilizados, no presente estudo, se deu após período de 72 dias, sendo considerados animais apresentando LP aqueles com contagem total de linfócitos superior a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ e contagem total de leucócitos superior a $15 \times 10^3/\mu\text{L}$ conforme critérios estabelecidos por Brenner et al. (2007).

	Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	VGM (%)	Hemoglobina (g/dl)
Valores	5,6 - 12,7	5,0 - 7,2	210 - 710	23,1 - 31,7	8,3 - 11,9

Fonte: (DIVERS; PIKE, 2008).

Legenda: VGM: volume globular médio.

Quadro 1 - Valores do volume globular médio, contagem total de leucócitos, hemácias, plaquetas, e concentração de hemoglobina de bovinos, utilizados como referência no presente estudo – São Paulo – 2009

Leucócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Monócitos	Basófilos
10³/μL	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; PIKE, 2008).

Quadro 2 - Valores do leucograma de bovinos sadios, em número absoluto e contagem diferencial relativa, utilizados como referência no presente estudo – São Paulo - 2009

4.1.2 Análise hematológica

A análise hematológica foi realizada por meio da mensuração pelo aparelho ABX[®] (Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, França), onde se obteve a contagem total de leucócitos por microlitro destes animais, que foi complementada pela contagem diferencial em esfregaços sangüíneos.

4.1.3 Sorodiagnóstico

O sorodiagnóstico foi realizado por kit comercial de imunodifusão em ágar gel (IDGA) (Tecpar[®], Curitiba, Brasil), e por kit comercial de ensaio imunoenzimático (ELISA) (VRMD, Pullman, EUA, n.º. cat. 284-5) através da detecção da glicoproteína gp51 do vírus da LEB, conforme recomendações do fabricante.

4.1.4 Quantificação de linfócitos B por citometria de fluxo

A quantificação das subpopulação de linfócitos B do sangue periférico foi realizada utilizando anticorpo monoclonal *mouse anti-bovine* CD21 (AbD Serotec, Oxford, Inglaterra, n.º. cat. MCA1424PE) conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE). Para tal, 100 μL de sangue periférico foram utilizados. Inicialmente, procedeu-se a lise hipotônica das amostras do sangue, e logo após as amostras foram submetidas à centrifugação a 250g por 8 minutos. Posteriormente, estas amostras foram ressuspensas em 1 mL de solução salina tamponada

(SST), e novamente submetidas á centrifugação. O botão celular resultante foi ressuspendido em 100 μ L de SST, e então incubado com 5 μ L do anticorpo *mouse anti-bovine* CD21 (excetuando-se os tubos sem marcação) por 30 minutos a temperatura ambiente sob ausência de luminosidade. Mais uma vez, foi adicionado a cada tubo 1 mL de SST, e centrifugado a 250g por 8 minutos. Posteriormente, estas amostras foram ressuspendidas em 300 μ L de SST com 0,1 % de albumina sérica bovina, e então analisadas por citometria de fluxo FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, EUA), onde 20.000 eventos correspondentes a subpopulação de linfócitos B foram adquiridos, como demonstrado na figura 1.

Figura 1 - À direita está representada a população de células do sangue periférico sem nenhuma marcação (FL2⁻), e à esquerda, está representada a população de linfócitos B (CD21⁺) (FL2⁺) do sangue total. Assim, para a quantificação de linfócitos B, 20.000 eventos foram salvos dentro da subpopulação de interesse, no caso representado pela região delimitada na figura à esquerda – São Paulo – 2009

A contagem total das diferentes subpopulações celulares se deu pela multiplicação da porcentagem da subpopulação de células B avaliada na citometria de fluxo pela contagem total de leucócitos encontrada na avaliação hematológica.

4.1.5 Concentração de hemoglobina

A determinação da concentração de hemoglobina (Hb) do concentrado de hemácias se deu por espectrofotometria utilizando kit comercial (Labtest, Santa Luzia, Brasil, ref 43). Para tal 20 μ L do sobrenadante do concentrado de hemácias diluído na proporção 1:1 foram adicionados a 05 mL de reagente de Drabkin's, e realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

4.1.6 Atividade da glutathione peroxidase

A determinação da atividade da GSH-Px eritrocitária foi realizada por kit comercial (RANSEL[®] Laboratories, Randox, Crumlin, UK, cat n° RS505, SC692), como descrito por Paglia e Valentine (1967).

Para a determinação desta enzima, o concentrado de hemácias foi previamente armazenado a -80 °C, sendo analisada em período máximo de 21 dias. O resultado da concentração de GSH-Px foi expresso em unidades de enzima por grama de hemoglobina.

4.1.7 Atividade da superóxido dismutase

A determinação da atividade da superóxido dismutase eritrocitária (SOD) foi realizada por kit comercial (RANSEL[®] Laboratories, Randox, Crumlin, UK, cat n° NX2332), como descrito por Woolliams et al. (1983).

Para a determinação desta enzima, o concentrado de hemácias foi previamente armazenado a -80 °C, sendo analisada em período máximo de 21 dias. O resultado da concentração de SOD foi expresso em unidades de enzima por grama de hemoglobina.

4.1.8 Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante total sérica foi mensurada segundo critérios estabelecidos por Miller et al. (1993), utilizando kit comercial (RANSEL[®] Laboratories, Randox, Crumlin, UK, cat n° RS505, SC692). Para tal determinação, as amostras de soro foram previamente congeladas a -80 °C, sendo analisadas no período máximo de seis meses.

4.1.9 Índice de peroxidação lipídica avaliado pelo teor de malondialdeído

O índice de peroxidação lipídica foi determinado pelo método do ácido tiobarbitúrico conforme estabelecido por Esterbauer e Cheeseman (1990). O referido método se baseia na reação do malondialdeído com o ácido tiobarbitúrico, em meio aquecido, quando este é submetido ao posterior resfriamento e mensurado em absorbância com comprimento de onda de 532 nm.

Primeiramente, pipetou-se 500 μ L de soro sanguíneo ou soluções padrão, nas concentrações de 1, 4 e 6 μ M para determinação da curva de concentração. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de ácido tricloroacético a 10 %. Estas amostras foram então submetidas à centrifugação por 15 minutos a 1800g.

Após a centrifugação, 750 μ L de ácido tiobarbitúrico a 1 % dissolvido em solução de hidróxido de sódio a 0,05 M foram adicionadas a 750 μ L das amostras, que foram então incubadas por 10 minutos em água fervente (100 °C), e imediatamente após resfriados em banho de gelo. A leitura das amostras foi realizada por espectrofotometria em comprimento de onda de 532 nm.

4.1.10 Determinação da glutathiona reduzida

A atividade da glutathiona reduzida foi determinada por método colorimétrico, descrito por Beutler et al. (1963). Para tal 200 μ L de sangue periférico ou soluções padrão, nas concentrações de 20, 50 e 100 mg/dL para determinação da curva de concentração, foram adicionadas a 1,8 mL de água deionizada. Em seguida, foram acrescentados 3,0 mL de solução precipitante (1,67 g de ácido metafosfórico glacial, 0,20 g de EDTA, 30,0 g de NaCl, em 100 mL de água deionizada). Após 5 minutos, foram centrifugadas as amostras por 05 minutos a 1800g.

Posteriormente, 200 μ L do sobrenadante foram adicionados a 0,8 mL de solução fosfato (42,6 g de NaHPO, em 1.000 mL de água deionizada). Finalmente, foi acrescentado 100 μ L de ácido ditionitrobenzóico (1,0 g de citrato de sódio, 40,0 mg de ácido ionitrobenzóico, em 100 mL de água deionizada). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro digital, marca Micronal® - modelo B34211, em comprimento de onda de 412 nm.

4.1.11 Análise estatística

A distribuição de Gaussian foi confirmada pelo teste de Kolmogorov e Smirnov. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância para verificar as diferenças entre os grupos. Caso houvesse diferença significativa, procedeu-se o teste de Turkey-Kramer para comparações múltiplas entre as médias. A correlação de Pearson foi utilizada para determinar a associação entre a contagem total de células B e a atividade da GSH-Px e SOD. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Foram consideradas significantes as análises que apresentaram $P < 0,05$.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Análise hematológica e sorodiagnóstico da LEB

Os resultados do hemograma completo do rebanho estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3. Os resultados da sorologia demonstraram 25,00 % de animais reagentes ao sorodiagnóstico por imunodifusão em ágar gel, e 87,00 % dos animais reagentes ao sorodiagnóstico por ELISA.

Tabela 1 - Valores do volume globular médio, contagem total de leucócitos, hemácias, plaquetas, e concentração de hemoglobina, dos 100 bovinos triados para o presente estudo – São Paulo - 2009

	Leucócitos (10³/μL)	Hemácias (10⁶/μL)	Plaquetas (10³/μL)	VGM (%)	Hemoglobina (g/dL)
Mediana	12,55	5,72	318,50	24,55	8,5
Mínimo-	7,60 –	3,96 –	69 –	16,60 –	6,20 –
Máximo	33,50	7,13	677	30,90	10,60
CV(%)	37,78	11,32	36,73	12,42	10,69

CV: Coeficiente de Variação

VGM: volume globular médio

Tabela 2 - Valores do leucograma, em número absoluto, dos 100 animais triados para o presente estudo – São Paulo - 2009

	Neutrófilos (10³/μL)	Linfócitos (10³/μL)	Eosinófilos (10³/μL)	Monócitos (10³/μL)	Basófilos (10³/μL)
Mediana	3,723	8,007	0,584	0,430	0
Mínimo- Máximo	0,42 – 14,70	1,97 – 26,47	0 – 2,63	0,08 – 1,76	0 – 0,08
CV (%)	47,22	54,47	80,55	65,67	10,10

CV: Coeficiente de Variação

Tabela 3 - Valores da contagem diferencial relativa de leucócitos dos 100 bovinos triados para o presente estudo – São Paulo - 2009

	Neutrófilos %	Linfócitos %	Eosinófilos %	Monócitos %	Basófilos %
Mediana	27,50	61,50	5,00	3,00	0
Mínimo- Máximo	04 – 65	24 – 93	00 – 24	01 – 10	0 – 82
CV (%)	41,85	22,41	84,41	60,56	10,17

CV: Coeficiente de Variação

Os dados hematológicos dos 15 animais utilizados no presente estudo divididos uniformemente entre os diferentes grupos estão apresentados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Valores de contagem total de leucócitos, de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos dos 15 bovinos utilizados no presente estudo subdivididos nos seus respectivos grupos – São Paulo – 2009

	Leucócitos (10³/μL)	Neutrófilos (10³/μL)	Linfócitos (10³/μL)	Eosinófilos (10³/μL)	Monócitos (10³/μL)
LP	19,7 (17,5 – 35,7) ^a	4368 (3088 – 5712) ^a	14381 (11700 – 29274) ^a	788 (357 – 1400) ^a	273 (175 – 714) ^a
CV (%)	31,75	21,42	39,04	50,59	62,86
AL	10,80 (9,6 – 12,0) ^b	2940 (2304 – 4095) ^a	6496 (5782 – 7236) ^b	756 (696 – 960) ^a	294 (108 – 464) ^a
CV (%)	9,16	24,69	8,39	14,10	46,43
Negativo	10,8 (9,6 – 11,7) ^b	2208 (1690 – 4680) ^a	6600 (5700 – 8532) ^b	960 (108 – 1482) ^a	228 (96 – 605) ^a
CV (%)	9,21	46,21	17,89	63,04	84,00

Letras diferentes entre linhas indicam P > 0,05

CV: coeficiente de variação

Negativos: animais não sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

AL: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina alinfocitóticos

LP: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina manifestando linfocitose persistente

Tabela 5 - Contagem diferencial relativa dos 15 bovinos utilizados no presente estudo subdivididos nos seus respectivos grupos – São Paulo – 2009

%	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Monócitos
LP	16 (16 - 25) ^{a*}	77 (66 - 82) ^a	04 (01 - 08) ^a	01 (01 - 02) ^a
CV (%)	21,70	8,61	68,09	39,29
AL	30 (24 - 35) ^a	59 (56 - 67) ^b	07 (06 - 10) ^a	03 (01 - 04) ^a
CV (%)	16,99	8,16	22,57	74,54
Negativo	23 (14 - 39) ^a	66 (50 - 78) ^{ab}	10 (01 - 13) ^a	02 (01 - 05) ^a
CV (%)	41,86	18,06	61,83	43,85

Letras diferentes entre linhas indicam $P > 0,05$. * $P = 0,06$.

CV: coeficiente de variação

Negativos: animais não sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

AL: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina alinfocitóticos

LP: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina manifestando linfocitose persistente

4.2.2 Quantificação de linfócitos B e sua correlação com GSH-Px e SOD

A porcentagem de linfócitos B no sangue periférico foi de 20,82^{a*} % ($\pm 3,65$), 23,40^{a**} % ($\pm 8,25$) e 41,82^b % ($\pm 6,30$) (* $P < 0,01$, ** $P < 0,001$) no grupo de animais negativos, AL e LP, respectivamente. A correlação entre a atividade da GSH-Px e a porcentagem de células B foi de $r = -0,107$ ($P = 0,704$), e entre a atividade da SOD e a porcentagem de linfócitos B foi de $r = -0,286$ ($P = 0,302$).

4.2.3 Atividade da GSH-Px e SOD

As concentrações eritrocitárias da GSH-Px e SOD dos animais não infectados e infectados estão apresentadas na tabela 6, e subdivididos nos seus respectivos grupos apresentados na tabela 7.

Tabela 6 - Concentração (média $\pm$ desvio-padrão) eritrocitária de GSH-Px e SOD dos 15 animais utilizados no presente estudo divididos em infectados e não infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina – São Paulo – 2009

	Negativo	Positivos	P
GSH-Px (U/g Hb)	351,29 $\pm$ 35,15 ^a	290,78 $\pm$ 52,61 ^b	0,038
SOD (U/g Hb)	2463,72 $\pm$ 466,25 ^a	2020,58 $\pm$ 412,23 ^a	0,082

Letras distintas entre linhas indicam $P < 0,05$.

GSH-Px: glutathione peroxidase eritrocitária

SOD: superóxido dismutase eritrocitária

Negativos: animais não sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

Positivos: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

P: valor de significância

Tabela 7 - Concentração (média $\pm$ desvio-padrão) eritrocitária de GSH-Px e SOD dos 15 animais utilizados no presente estudo subdivididos nos seus respectivos grupos – São Paulo – 2009

	Negativo	AL	LP	P
GSH-Px	351,29 $\pm$	277,24 $\pm$	304,33 $\pm$	0,087
(U/g Hb)	35,15 ^a	63,88 ^a	41,08 ^a	
SOD	2463,72 $\pm$	1883,35 $\pm$	2157,80 $\pm$	0,144
(U/g Hb)	466,25 ^a	462,54 ^a	348,34 ^a	

Letras distintas entre linhas indicam $P < 0,05$.

GSH-Px: glutathione peroxidase eritrocitária

SOD: superóxido dismutase eritrocitária

Negativos: animais não sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

AL: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina alinfocitóticos

LP: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina manifestando linfocitose persistente

P: valor de significância

4.2.4 Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante total dos animais não infectados e infectados, assim como subdivididos nos seus respectivos grupos apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Quantificação da capacidade antioxidante total das amostras séricas dos 15 animais utilizados no presente estudo subdivididos nos seus respectivos grupos – São Paulo – 2009

AAT	Negativos	AL	LP	Postivos
($\mu\text{mol/L}$)	0,814 $\pm$ 0,071 ^a	0,793 $\pm$ 0,116 ^a	0,837 $\pm$ 0,077 ^a	0,815 $\pm$ 0,097 ^a
P		0,704**	0,704**	0,689*

AAT: atividade antioxidante total

Negativos: animais não sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

Positivos: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

AL: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina alinfocitóticos

LP: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina manifestando linfocitose persistente

P: valor de significância. *entre os animais considerados positivos e negativos; ** entre os animais negativos, AL e LP.

4.2.5 Concentração de Malondialdeído e Glutathione reduzida

As concentrações de malondialdeído e de glutathione reduzida dos animais não infectados e infectados estão apresentadas na tabela 9, assim como subdivididos nos seus respectivos grupos apresentados na tabela 10.

Tabela 09 - Concentração (média $\pm$ desvio-padrão) de malondialdeído (nmol/L) e glutathiona reduzida (μ mol/L) dos 15 animais utilizados no presente estudo divididos em infectados e não infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina – São Paulo – 2009

	Negativos	Positivos	P
MDA (nmol/L)	0,366 $\pm$ 0,202 ^a	0,341 $\pm$ 0,243 ^a	0,844
GSH (μ mol/L)	26,63 $\pm$ 3,76 ^a	28,49 $\pm$ 5,74 ^a	0,528

Letras distintas entre linhas indicam $P < 0,05$.

MDA: malondialdeído

GSH: glutathiona reduzida

Negativos: animais não sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

Positivos: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

Tabela 10 - Concentração (média $\pm$ desvio-padrão) de malondialdeído (nmol/L) e glutathiona reduzida (μ mol/L) dos 15 animais utilizados no presente estudo subdivididos nos seus respectivos grupos – São Paulo – 2009

	Negativos	AL	LP	P
MDA (nmol/L)	0,366 $\pm$ 0,202 ^a	0,325 $\pm$ 0,224 ^a	0,357 $\pm$ 0,286 ^a	0,954
GSH (μ mol/L)	26,63 $\pm$ 3,76 ^a	29,78 $\pm$ 5,95 ^a	27,19 $\pm$ 5,93 ^a	0,617

Letras distintas entre linhas indicam $P < 0,05$.

MDA: malondialdeído

GSH: glutathiona reduzida

Negativos: animais não sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

AL: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina alinfocitóticos

LP: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina manifestando linfocitose persistente

4.3 DISCUSSÃO

A GSH-Px e a SOD são duas enzimas que contribuem para a manutenção da homeostase oxidativa intracelular. A superóxido dismutase catalisa a conversão de ânions superóxido a peróxido de hidrogênio e água, enquanto a glutathione peroxidase metaboliza o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Considerando a menor atividade da GSH-Px e a tendência a menor atividade da SOD, o presente trabalho reforça a idéia do envolvimento do estresse oxidativo na infecção pelo VLEB em bovinos naturalmente infectados. Tal fato corroborou com achados relatados por outros pesquisadores em linhagens de células B e ovinos experimentalmente infectados que demonstraram o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese do VLEB (BONDZIO et al., 2001; BONDZIO et al., 2003; ALCARAZ et al., 2004; BOUZAR et al., 2009).

Similarmente, alguns estudos apontaram para a redução do conteúdo de selênio e da atividade da GSH-Px (DWORKIN et al., 1988; DWORKIN et al., 1994; BAUM et al., 1997; LEI et al., 2007; KHALILI et al., 2008), e do conteúdo de zinco (Zn) (KHALILI et al., 2008) e também da atividade da superóxido dismutase no plasma e em células mononucleares em pacientes infectados pelo VIH (TREITINGER et al., 2000). Além disso, a infecção pelo vírus do Epstein-Barr em humanos, que também infecta células B e persiste por toda a vida do paciente, foi associada com a diminuição da atividade da superóxido dismutase (LASSOUED et al., 2008).

Foi referido efeito citoprotetor do zinco que pode inibir as principais vias que levam a apoptose, assim como os efeitos diretos do zinco na regulação da apoptose, especialmente nas famílias enzimáticas das caspases. Estes mecanismos são intimamente relacionados com o declínio do Zn intracelular que pode resultar na ativação das caspases. Neste contexto, estudos demonstraram que o Zn está co-localizado com o precursor da caspase-3, na mitocôndria e microtubulos, sugerindo que o Zn apresenta função crítica no controle da apoptose (TRUONG-TRAN et al., 2001).

Inesperadamente, a redução das enzimas antioxidantes avaliadas no presente estudo não pode ser correlacionada ao aumento de linfócitos B resultante da manifestação de LP em animais infectados pelo VLEB, nem sequer menor atividade destas enzimas nos animais manifestando LP comparados aos animais AL.

Neste contexto, algumas retrovírus codificam selenoproteínas, como a glutathione peroxidase. A existência destas selenoproteínas, como ocorre com VIH, pode explicar a tendência do aumento da expressão destas selenoproteínas nas células infectadas, que podem competir por estes oligoelementos sugerindo possível seqüestro deste microelemento pelo próprio vírus. Ademais, a inibição do efeito das ERO pelas selenoproteínas virais pode explicar a inibição do processo apoptótico das células infectadas. Assim, a GSH-Px codificada pelo vírus pode apresentar efeito citoprotetor e função patofisiológica relevante na infecção pelo VLEB, como já descrito para o VIH (ZHAO et al., 2000; COHEN et al., 2004). Curiosamente, o isolamento do VIH de pacientes em que a infecção não progride geralmente codifica o gene da GSH-Px, enquanto que em indivíduos em que a infecção evolue com manifestação da SIDA, geralmente apresentam mutantes da GSH-Px não funcionais (COHEN et al., 2004). Deste modo, a possibilidade que o VLEB codificar tais proteínas antioxidantes deve ser considerada e investigada.

Alcaraz et al. (2004) demonstraram que aumento das concentrações intracelulares de glutathione reduzida (GSH) foram implicados na proteção indireta contra a apoptose, associado ao aumento da sobrevivência de linfócitos B em ovinos infectados pelo VLEB. Entretanto, a inibição do processo apoptótico não foi correlacionada com a atividade da GSH-Px e da glutathione reductase (GR), sugerindo que outras vias como a depleção da glutathione transferase, modulam a concentração de glutathione.

Bouzar et al. (2009) demonstraram que células B isoladas de ovinos infectados pelo VLEB apresentaram menor produção de ERO comparado com animais não infectados. Foi também relatado que o aumento da expressão da TRX em células mononucleares do sangue periférico nos ovinos infectados. Entretanto, deve ser enfatizado que a dinâmica celular envolvida na patogênese do VLEB em bovinos (hospedeiros naturais) apresenta diferenças marcantes com os ovinos (FLORINS et al., 2007; GILLET et al., 2007).

Contudo, não se observou diferenças nos marcadores biológicos de estresse oxidativo, no caso dado pela concentração de malondialdeído e do conteúdo de glutathione reduzida. Sugere-se, que apesar da menor atividade da GSH-Px e da SOD, e a inesperada inalteração da atividade antioxidante total, a atividade antioxidante possa ser compensada por outros sistemas antioxidantes. Seria possível que a compensação da deficiência de glutathione peroxidase e outros antioxidantes estejam associados ao aumento sérico da catalase, atividade que está correlacionada com a eliminação do peróxido de hidrogênio, ou outros sistemas antioxidantes, como ocorre com o VIH (LEFF et al., 1992).

Até onde se tem conhecimento, o presente trabalho foi pioneiro na investigação da proteção antioxidante, no caso a atividade da GSH-Px, da SOD e da atividade antioxidante total em bovinos naturalmente infectados pelo VLEB. O conceito de alvos terapêuticos que controlam a expressão viral ou genes que regulam importantes atividades celulares como o sistema antioxidante pode representar ferramenta promissora no tratamento e controle da LEB e doenças similares como a leucemia de células T em humanos, doenças que não apresentam nenhum tratamento satisfatório até o presente momento (ACHACHI et al., 2005).

Capítulo 2. Avaliação funcional de leucócitos polimorfonucleares de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina

5 INTRODUÇÃO

O vírus da leucose enzoótica bovina (VLEB) pertence ao gênero deltaretrovírus compartilhando arranjo genético e estrutural aos vírus linfotrópicos de células T de primatas (vírus linfotrópicos de células T de humanos – HTLV tipos 1, 2, 3 e 4 – e os vírus linfotrópicos de células T de símios STLV tipos 1, 2, 3 e 5) (GILLET et al., 2007). O VLEB apresenta tropismo pelos linfócitos B, podendo infectar outras populações celulares como células T citotóxicas, monócitos e granulócitos (SCHWARTZ et al., 1994).

Várias viroses, análogas a certos microorganismos, especialmente patógenos intracelulares, podem afetar a regulação das funções celulares de leucócitos polimorfonucleares. Este fenômeno predispõe a diferentes coinfeções ou superinfecções ou aumentam sua severidade (PUGLIESE et al., 2005). Concernente a isso, alguns autores têm associado o VLEB a coinfeções com alguns microorganismos (FITZGERALD et al., 2009; VANLEEUEWEN et al., 2009). Ademais, tem sido sugerido um potencial imunossupressivo da leucose enzoótica bovina, com possível desencadeamento de outras doenças oportunistas (TRAINEN et al., 1996).

Recentemente, foi demonstrado que a capacidade fagocítica (AZEDO et al., 2008) e a produção intracelular de peróxido de hidrogênio (AZEDO, 2007) de leucócitos provenientes de animais infectados pelo VLEB manifestando LP estavam reduzidas comparadas com animais infectados pelo VLEB alinfocitóticos e animais considerados negativos, no caso, não sororreagentes à IDGA.

Deste modo, o presente estudo busca elucidar a função fagocítica e a produção intracelular de peróxido de hidrogênio de leucócitos polimorfonucleares de bovinos naturalmente infectados pelo VLEB manifestando ou não LP.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Animais e delineamento experimental

Foram coletadas amostras sanguíneas de 100 fêmeas bovinas adultas da raça holandesa, oriundas de rebanhos destinados à produção de leite localizado no Estado de São

Paulo. Dentre estes animais, foram selecionados 15 animais subdivididos uniformemente conforme o resultado do sorodiagnóstico e do leucograma, em animais com sorodiagnóstico negativo, com sorodiagnóstico positivo alinfocitóticos, e animais com sorodiagnóstico positivo apresentando LP. Todos os animais incluídos no presente não apresentavam alterações clínicas evidentes, ou alterações hematológicas nos grupos de animais considerados negativos e AL. A persistência da linfocitose dos animais utilizados, no presente estudo, se deu após período de 72 dias, sendo considerados animais apresentando LP aqueles com contagem total de linfócitos superior a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ e contagem total de leucócitos superior a $15 \times 10^3/\mu\text{L}$ conforme critérios estabelecidos por Brenner et al. (2007).

5.1.2 Análise hematológica

A análise hematológica foi realizada por meio da mensuração pelo aparelho ABX[®] (Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, França), onde se obteve a contagem total de leucócitos por microlitro destes animais, que foi complementada pela contagem diferencial em esfregaços sangüíneos.

5.1.3 Sorodiagnóstico

O sorodiagnóstico foi realizado por kit comercial de imunodifusão em ágar gel (Tecpar[®], Curitiba, Brasil), e por kit comercial de ELISA (VRMD, Pullman, EUA, n°. cat. 284-5) através da detecção da glicoproteína gp51 do vírus da LEB, conforme recomendações do fabricante.

5.1.4 Conjugação de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* ao iodeto de propídio

Para a realização do ensaio de fagocitose, foi necessária a conjugação de *Escherichia coli* (O98:H28) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a iodeto de propídio (Sigma Aldrich,

St. Louis, EUA, n°. cat. P4170). Tal procedimento foi realizado conforme critérios estabelecidos por Hasui et al. (1989), com algumas modificações.

Resumidamente, amostra de cada cepa bacteriana foi cultivada em caldo cérebro-coração (BD, Franklin Lakes, EUA, n°. cat. 237500), e posteriormente semeada em placas de petri contendo ágar cérebro-coração (BD DIFCO™, Franklin Lakes, EUA, n°. cat. 241830), e então incubada a 37 °C por 18 horas. Após o crescimento bacteriano, as colônias foram retiradas e transferidas para tubos cônicos de 15 mL contendo solução salina isotônica estéril, sendo então centrifugados a 1100 g por 10 minutos, e incubadas em banho-maria a 60 °C por 30 minutos. Após este período, desprezou-se o sobrenadante, ressuspensão em solução salina isotônica estéril. Repetiu-se este processo por mais duas vezes.

Posteriormente, mensurou-se a absorbância por espectrofotometria (comprimento de onda de 620 nm) do infranadante, ajustando a concentração 08 da escala de Mac Farland. Realizou-se posteriormente a conjugação ao iodeto de propídio, onde 25 µL de iodeto de propídio a 5% foram adicionados a cada 1 mL do infranadante, e então incubado por 30 minutos sob ausência de luminosidade.

Logo após, ressuspendeu-se em 10 mL de solução salina estéril, e centrifugou-se a 1100g por 10 minutos, repetindo este processo por mais duas vezes. Finalmente, resuspendeu-se o infranadante em SST glicosada (5mM de glicose, 0,1 % gelatina) na proporção 1:10, ou seja 09 mL de SST glicosada para cada 1 mL de infranadante. Estas amostras foram aliquotadas e estocadas a -80 °C. Uma alíquota de cada cepa bacteriana foi submetida à citometria de fluxo para verificação da conjugação ao iodeto de propídio.

A verificação da conjugação do iodeto de propídeo á bactérias *S. aureus* e *E. coli* se deu por citometria de fluxo (Figura 2). A interiorização dos patógenos dos fagócitos foi confirmada por microscopia confocal (Figura 3).

Figura 2 - Demonstração da intensidade de fluorescência das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* não conjugadas ao iodeto de propídio (à esquerda) e conjugadas ao iodeto de propídio (à direita) verificadas pelo citometria de fluxo – São Paulo – 2009

Figura 3 - Confirmação da interiorização dos patógenos (em vermelho) *Staphylococcus aureus* (à direita) e *Escherichia coli* (à esquerda) conjugados ao iodeto de propídio no interior dos fagócitos por microscopia confocal – São Paulo – 2009

5.1.5 Avaliação da função fagocítica e da produção intracelular de peróxido de hidrogênio

Os ensaios para a avaliação da fagocitose de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* conjugadas com iodeto de propídio e produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) da população de células polimorfonucleares foi realizado conforme proposto por Hasui et al. (1989) com algumas modificações.

Em síntese, a avaliação da produção intracelular de H_2O_2 e a fagocitose se deram pela utilização de 100 μ L de sangue de cada animal que foi incubado a 37° C por 30 minutos com 0,3 μ M de 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA, n°. cat. D6883) (produção intracelular de peróxido de hidrogênio) e pelas partículas de *S. aureus* e *E. coli* conjugadas a iodeto de propídio (fagocitose). Em paralelo, foi realizado o mesmo ensaio, onde foi avaliada a produção intracelular de H_2O_2 sob os seguintes estímulos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (O98:H28) conjugadas a iodeto, e lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (cepa O55:b5) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n°. cat. L-3129) na concentração final de 0,1 mg/mL.

Após o período de incubação, 2 mL de solução gelada de ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (3 mM) foi adicionado a cada tubo, e centrifugado a 250 g por 8 minutos. Logo após, procedeu-se a lise hipotônica dos eritrócitos, sendo novamente os tubos submetidos à centrifugação. Finalmente, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 300 μ L de SST à suspensão celular.

As amostras foram, então, analisadas por citometria de fluxo, onde 20.000 eventos referentes à população de polimorfonucleares foram adquiridos. A população de leucócitos polimorfonucleares (PMN) foram identificadas pela suas características de tamanho e granulosidade (WEINGARTEN et al., 1993; KAMPEN et al., 2004) dada pela citometria de fluxo, e demonstrado na figura 4.

Figura 4 - Dot plots demonstrando o tamanho (forward scatter [FSC-H]) e granulosidade celular (side scatter [SSC-H]) das células do sangue periférico de bovinos, onde está delimitada a população de células polimorfonucleares – São Paulo – 2009

5.1.6 Análise estatística

A distribuição de Gaussian foi confirmada pelo teste de Kolmogorov e Smirnov. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância para verificar as diferenças entre os grupos. Caso houvesse diferença significativa, procedeu-se o teste de Turkey-Kramer para comparações múltiplas entre as médias. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prisma 5.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Foram consideradas significantes as análises que apresentaram $P < 0,05$.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Análise hematológica e sorodiagnóstico da LEB

Os resultados da sorologia demonstraram 25,00 % de animais reagentes ao sorodiagnóstico por IDGA, e 87,00 % dos animais reagentes ao sorodiagnóstico por ELISA. Os dados hematológicos dos 15 animais utilizados no presente estudo divididos uniformemente entre os diferentes grupos estão apresentados nas tabelas 4 e 5.

5.2.2 Função fagocítica e produção intracelular de peróxido de hidrogênio

A fagocitose de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, assim como a produção intracelular de peróxido de hidrogênio dos leucócitos polimorfonucleares sob diferentes estímulos nos distintos grupos estão apresentados nas tabelas 11 e 12. Verificou-se a resposta fagocítica de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* das células polimorfonucleares dos 15 animais, e ainda a resposta da produção intracelular de peróxido de hidrogênio dos PMN destes animais frente a diferentes estímulos como demonstrado nas tabelas 13 e 14.

Tabela 11 - Valores (média $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de granulócitos que realizaram fagocitose (células responsivas), e intensidade de fagocitose, em valores arbitrários – São Paulo – 2009

	Fagocitose	Negativos	AL	LP
<i>Staphylococcus aureus</i>	% de Células	59,12 $\pm$	48,16 $\pm$	59,83 $\pm$
	Responsivas	12,30 ^a	12,50 ^a	6,47 ^a
	Intensidade de Fagocitose	61,55 $\pm$ 17,47 ^a	41,22 $\pm$ 15,02 ^a	58,77 $\pm$ 18,36 ^a
<i>Escherichia coli</i>	% de Células	30,13 $\pm$	24,02 $\pm$	32,70 $\pm$
	Responsivas	18,59 ^a	6,71 ^a	7,45 ^a
	Intensidade de Fagocitose	21,60 $\pm$ 11,42 ^a	17,86 $\pm$ 11,11 ^a	21,53 $\pm$ 9,19 ^a

Letras distintas entre linhas indicam $P > 0,05$.

Negativos: animais não sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

AL: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina alinfocitóticos

LP: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina manifestando linfocitose persistente

Tabela 12 - Valores (média $\pm$ desvio-padrão) da intensidade fluorescência dada pelo DCF, em valores arbitrários, e da porcentagem de granulócitos que produziram peróxido de hidrogênio sob os diferentes estímulos nos distintos grupos – São Paulo – 2009

	Mensuração da Produção de Peróxido de Hidrogênio	Negativo	AL	LP
Sem Estímulo	Intensidade de Fluorescência	711,57 $\pm$ 385,12 ^a	630,63 $\pm$ 290,12	665,60 $\pm$ 189,25 ^a
	Porcentagem de Células Responsivas	84,13 $\pm$ 13,51 ^a	75,99 $\pm$ 20,31 ^a	89,10 $\pm$ 9,53 ^a
	Intensidade de Fluorescência	1692,11 $\pm$ 1566,60 ^a	1084,20 $\pm$ 395,69 ^a	1125,95 $\pm$ 283,21 ^a
	Porcentagem de Células Responsivas	84,75 $\pm$ 15,40 ^a	88,66 $\pm$ 10,58	87,73 $\pm$ 10,41 ^a
Fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i>	Intensidade de Fluorescência	1412,54 $\pm$ 746,21 ^a	1037,36 $\pm$ 541,59	1100,27 $\pm$ 281,28 ^a
	Porcentagem de Células Responsivas	92,71 $\pm$ 5,08 ^a	90,62 $\pm$ 13,23 ^a	92,54 $\pm$ 7,21 ^a
	Intensidade de Fluorescência	1112,79 $\pm$ 191,06 ^a	902,32 $\pm$ 266,49 ^a	1175,01 $\pm$ 198,45 ^a
	Porcentagem de Células Responsivas	99,14 $\pm$ 0,32 ^a	98,19 $\pm$ 1,83 ^a	99,61 $\pm$ 0,19 ^a
Fagocitose de <i>Escherichia coli</i>	Intensidade de Fluorescência	1112,79 $\pm$ 191,06 ^a	902,32 $\pm$ 266,49 ^a	1175,01 $\pm$ 198,45 ^a
	Porcentagem de Células Responsivas	99,14 $\pm$ 0,32 ^a	98,19 $\pm$ 1,83 ^a	99,61 $\pm$ 0,19 ^a
	Intensidade de Fluorescência	1112,79 $\pm$ 191,06 ^a	902,32 $\pm$ 266,49 ^a	1175,01 $\pm$ 198,45 ^a
	Porcentagem de Células Responsivas	99,14 $\pm$ 0,32 ^a	98,19 $\pm$ 1,83 ^a	99,61 $\pm$ 0,19 ^a
LPS	Intensidade de Fluorescência	1112,79 $\pm$ 191,06 ^a	902,32 $\pm$ 266,49 ^a	1175,01 $\pm$ 198,45 ^a
	Porcentagem de Células Responsivas	99,14 $\pm$ 0,32 ^a	98,19 $\pm$ 1,83 ^a	99,61 $\pm$ 0,19 ^a
	Intensidade de Fluorescência	1112,79 $\pm$ 191,06 ^a	902,32 $\pm$ 266,49 ^a	1175,01 $\pm$ 198,45 ^a
	Porcentagem de Células Responsivas	99,14 $\pm$ 0,32 ^a	98,19 $\pm$ 1,83 ^a	99,61 $\pm$ 0,19 ^a

Letras distintas entre colunas indicam $P > 0,05$.

LPS: lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* O127:B8

DCF: 2,7 diclorofluoresceína

Negativos: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

AL: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina alinfocitóticos

LP: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina manifestando linfocitose persistente

Tabela 13 - Valores (média $\pm$ desvio-padrão) da porcentagem de leucócitos polimorfonucleares dos 15 animais que realizaram fagocitose (células responsivas), assim como a intensidade de fagocitose, em valores arbitrários – São Paulo – 2009

Fagocitose	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
% de Células Responsivas	55,04 $\pm$ 11,92 ^a	28,95 $\pm$ 11,90 ^b
Intensidade de Fagocitose	53,84 $\pm$ 18,30 ^a	20,33 $\pm$ 10,00 ^b

Letras distintas entre colunas indicam $P > 0,0001$.

Tabela 14 - Valores (média $\pm$ desvio-padrão) da intensidade fluorescência dada pelo DCF, em valores arbitrários, e da porcentagem de leucócitos polimorfonucleares que produziram peróxido de hidrogênio sob os diferentes estímulos dos 15 animais utilizados no presente estudo – São Paulo – 2009

Mensuração da Produção de Peróxido de Hidrogênio	Sem Estímulo	Fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i>	Fagocitose de <i>Escherichia coli</i>	LPS
Intensidade de Fluorescência	669,26 $\pm$ 278,99 ^a	1300,75 $\pm$ 922,63 ^{b***}	1183,39 $\pm$ 542,53 ^{b**}	1063,38 $\pm$ 237,82 ^{b*}
Porcentagem de Células Responsivas	83,08 $\pm$ 15,08 ^a	87,04 $\pm$ 11,56 ^{b*}	91,95 $\pm$ 8,56 ^{b**}	98,80 $\pm$ 1,32 ^{b***}

Letras diferentes entre colunas indicam $P > 0,05$. * $P > 0,05$. ** $P > 0,01$. *** $P > 0,001$

LPS: lipopolissacaríde de *Escherichia coli* O127:B8

DCF: 2,7 diclorofluoresceína

Negativos: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina

AL: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina alinfocitóticos

LP: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina manifestando linfocitose persistente

5.3 DISCUSSÃO

Os leucócitos polimorfonucleares são as principais células envolvidas na resposta imune inata contra patógenos invasores pelo processo conhecido como fagocitose. Durante a fagocitose, os PMN produzem ERO, incluindo superóxidos, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, altamente efetivas no combate aos patógenos (KOBAYASHI et al., 2003).

Embora, a resposta imune adaptativa tenha sido extensivamente estudada na infecção pelo VLEB, poucos são os estudos que avaliaram a resposta imune inata. O primeiro relato que avaliou a função de PMN é atribuído a Walker et al. (1987) em ovinos experimentalmente infectados. Neste estudo, a infecção pelo VLEB não alterava a função dos PMN dada pela aderência, migração, quimiotaxia, fagocitose e capacidade microbicida. Salienta-se que os ovinos não são hospedeiros naturais do VLEB, sendo que a infecção nestes animais é mais aguda ao comparar com os bovinos (DEBACQ et al., 2003).

Posteriormente, foi identificado que o VLEB infectava também os PMN (SCHWARTZ et al., 1994) e alguns autores observaram redução da função fagocítica e a produção intracelular de peróxido de hidrogênio de leucócitos provenientes de animais naturalmente infectados manifestando LP (AZEDO, 2007; AZEDO et al., 2008).

O presente estudo não encontrou nenhuma diferença na capacidade fagocítica e na produção intracelular de peróxido de hidrogênio de PMN de bovinos naturalmente infectados pelo VLEB com ou sem manifestação de LP. Deste modo, sugere-se que a diminuição da capacidade fagocítica e na produção intracelular de peróxido de hidrogênio observada nos animais manifestando LP (AZEDO, 2007; AZEDO et al., 2008) pode advir da menor porcentagem de PMN devido ao expressivo aumento de linfócitos B nos animais infectados manifestando LP.

Adicionalmente a isso, Kaczmarczyk et al. (2005) ao investigar a capacidade microbicida pela redução do nitroazul de tetrazólio de fagócitos em bovinos naturalmente infectados pelo VLEB também não encontrou diferenças significativas entre os animais infectados e sadios, embora os animais infectados não foram discriminados pela manifestação da LP.

Capítulo 3. Proliferação e apoptose de linfócitos de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina

6 INTRODUÇÃO

O vírus da leucose enzoótica bovina (VLEB) é um dos mais prevalentes patógenos em vários países, principalmente em rebanhos leiteiros. É um deltaretrovírus oncogênico associado ao desenvolvimento de LP e linfossarcomas em bovinos. A LP é caracterizada por elevação crônica do número de linfócitos circulantes, no caso linfócitos B, sendo encontrada em aproximadamente 20 a 30 % dos animais infectados (GILLET et al., 2007). Tumores nos órgãos linfóides são encontrados em cerca de 0,1 a 10 % dos animais infectados, enquanto a maioria dos animais infectados permanecem assintomáticos ou alinfocitóticos (AL) (GILLET et al., 2007).

A homeostase de linfócitos é resultado do balanço crítico entre a proliferação e a morte celular. A ruptura deste equilíbrio pode levar a manifestação da LP (DEBACQ et al., 2002). Assim, a modulação do processo apoptótico associado ou não ao aumento da proliferação celular pode refletir no aumento dos linfócitos B circulantes (CD21⁺), que geralmente co-expressam a molécula CD5 e a integrina CD11b, nos animais infectados pelo VLEB manifestando LP (DEBACQ et al., 2003). Tal modulação pode ser responsável pela persistência da infecção e/ou pela progressão da enfermidade, enquanto células infectadas que apresentam antígenos virais são reconhecidas e eliminadas pelo hospedeiro (GILLET et al., 2007; CLARKE; TYLER, 2009).

O presente estudo buscou avaliar a proliferação de linfócitos e a apoptose de células CD5⁺ em vacas holandesas em lactação infectadas pelo VLEB manifestando ou não LP.

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 Animais e delineamento experimental

Foram coletadas amostras sangüíneas de 100 fêmeas bovinas adultas da raça holandesa, oriundas de rebanhos destinados à produção de leite localizado no Estado de São Paulo. Dentre estes animais, foram selecionados 15 animais subdivididos uniformemente conforme o resultado do sorodiagnóstico e do leucograma, em animais com sorodiagnóstico

negativo, com sorodiagnóstico positivo alinfocitóticos, grupos nos quais foram selecionados animais sem alterações hematológicas conforme critérios estabelecidos para a espécie (Quadro 1 e 2) e sem alterações clínicas evidentes, e animais com sorodiagnóstico positivo apresentando LP. A persistência da linfocitose dos animais utilizados, no presente estudo, se deu após período de 72 dias, sendo considerados animais apresentando LP aqueles com contagem total de linfócitos superior a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ e contagem total de leucócitos superior a $15 \times 10^3/\mu\text{L}$ conforme critérios estabelecidos por Brenner et al. (2007).

6.1.2 Análise hematológica

A análise hematológica foi realizada por meio da mensuração pelo aparelho ABX[®] (Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, França), onde se obteve a contagem total de leucócitos por microlitro destes animais, que foi complementada pela contagem diferencial em esfregaços sangüíneos.

6.1.3 Sorodiagnóstico

O sorodiagnóstico foi realizado por kit comercial de IDGA (Tecpar[®], Curitiba, Brasil), e por kit comercial de ELISA (VRMD, Pullman, EUA, n°. cat. 284-5) através da detecção da glicoproteína gp51 do vírus da LEB, conforme recomendações do fabricante.

6.1.4 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas por gradiente de densidade Ficoll-PaqueTM Plus[®] (GEHealthcare, EUA, n°. cat. 17-1440-03) (densidade $1,077 \text{ g/cm}^3$) em fluxo laminar. Resumidamente, 10 mL de sangue periférico foram adicionadas a 10 mL de meio de cultura celular RPMI-1640[®] (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n°. cat. R7638) contendo 2 mM de L-glutamina (GIBCOTM Invitrogen, Grand Island, EUA, n°. cat. 21051-024) e $5 \times 10^{-2} \text{ mM}$ de 2-mercaptoetanol (Invitrogen, Grand Island,

EUA, n°. cat. 21985-023). Esta solução celular resultante foi então cuidadosamente colocada sobre a fase de Ficoll, e submetida à centrifugação 700g por 40 minutos a 18° C. Após a centrifugação, a camada de células mononucleares, localizada na interfase entre a camada de Ficoll e constituintes do plasma, foi coletada e transferida para tubo cônico de 15 mL, que foi completado com RPMI-1640[®], e submetido à centrifugação (250g por 8 minutos). Posteriormente, procedeu-se a lise das hemácias utilizando 10 mL de solução de cloreto de amônio (0,8 % de NH₄Cl, 0,1 mM EDTA). Logo após, foi realizada nova centrifugação (250g por 8 minutos), e o botão celular resultante ressuspensionado em 4 mL de RPMI-1640[®].

6.1.5 Proliferação de linfócitos

A avaliação da proliferação celular se deu pela utilização do CFSE-DA (5-(6-) *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) (5 mM/mL) (Invitrogen, Carlsbad, EUA, n°. cat. C1157) como descrito Lyons e Parish (1994), Lyons (2000) e Hawkins et al. (2007). Os ensaios de proliferação linfocitária também foram induzidos por concavalina-A tipo III (10 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n°. cat. C2631), por lipopolisacárides (LPS) de *Escherichia coli* (cepa O127:B8) (25 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n°. cat. L3129), e selenito de sódio (1, 10 e 50 mM/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n°. cat. 21448-5). A suplementação de selenito de sódio se deu por ser uma fonte de selênio amplamente utilizada.

Para as avaliações da proliferação dos linfócitos, o sangue periférico inicialmente foi submetido à separação de mononucleares por gradiente de densidade Ficoll, como anteriormente descrito. As células foram, então, contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, EUA, cat. n° 368-12), permitindo a verificação de viabilidade dos linfócitos bem como o ajuste do número de células para 1x10⁷ células/mL.

Mediante a obtenção e o ajuste do número de linfócitos, adicionou-se às amostras 1 µL do fluorocromo CFSE-DA, que foi incubado por 20 minutos em estufa a 37° C, 5% CO₂. Posteriormente, centrifugou-se as amostras e ressuspendeu-as em RPMI-1640[®] estéril contendo 10 % soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil), 2mM de L-glutamina, 5 x 10⁻² mM de 2-mercapoetanol. Então, realizou-se o reajuste celular para 2,2x10⁶ células/ml com o objetivo de ter 2x10⁵ células por poço de cultura (90 µl). Ajustadas as suspensões celulares, estas foram plaqueadas em triplicata, juntamente com seus respectivos estímulos (10 µl), e

mantidas em cultura celular em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ por três dias, para posterior avaliação por citometria de fluxo, onde 50.000 eventos foram adquiridos.

O cálculo da proliferação deu-se pela análise da população correspondente aos linfócitos, e suas respectivas subpopulações (linfócitos B e T), no *software FlowJo*, o qual calcula a progressão geométrica de decaimento do fluorocromo CFSE das células. Considera-se que cada célula plaqueada continha 100% do CFSE fornecido, ao realizar mitose, 50% de fluorocromo resta em cada célula-filha. Estas, à divisão, fornecem 25% a cada célula-filha, das quais as filhas por sua vez passam a ter 12,5% do fluorocromo, e assim sucessivamente (LYONS; PARISH, 1994; LYONS, 2000; HAWKINS et al., 2007), como ilustrado na figura 5.

Figura 5 - O histograma à esquerda ilustra a proliferação de um animal com alta resposta mitogênica, ou seja índice de divisão celular igual a 0,98 e 68 % dos linfócitos responsivos, e à direita outro animal com baixa resposta mitogênica, com índice de proliferação igual a 0,04 e apenas 2,68 % das células responsivas, onde pode se observar um deslocamento para a esquerda dado pelo decaimento do fluorocromo CFSE (FL1⁺) – São Paulo – 2009

6.1.6 Apoptose

A expressão da fosfatilserina (FS) na superfície celular é um dos marcadores precoces do processo apoptótico. A porcentagem de células CD5⁺ sofrendo apoptose foi realizada utilizando a anexina V-FITC (APOPTTESTTM-FITC, Dako Cytomation, Finlândia, cat. Number K2350) e analisados por citometria de fluxo, como descrito por Vermes et al. (1995) com algumas modificações.

Para tal, 100 µL de sangue venosos heparinizado foram utilizados. Inicialmente, os eritrócitos foram lisados, e submetidos a centrifugação, e então ressuspensos em 1,000 µL

de tampão de ligação (10 mM Hepes/ 150mM NaCl/ 1mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂). Posteriormente, submeteu-se as amostras a nova centrifugação, e ressuspendeu-as em 100 µL de tampão de ligação com anexina V-FITC, e finalmente incubou a suspensão celular por 20 minutos a temperatura ambiente sob ausência de luminosidade.

6.1.7 Identificação de células CD5⁺

A quantificação da população de linfócitos CD5⁺ do sangue total foi realizada utilizando anticorpo monoclonal primário: *mouse* IgG2a *anti-bovine* CD5 (VRMD, Pullman, EUA, n°. cat. B29A), e anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse* IgG2a conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE) (Invitrogen, Carlsbad, EUA, n°. cat. M32204).

Para tal, as amostras após a realização do ensaio para determinação do processo apoptótico foram então submetidas à centrifugação a 250g por 8 minutos. O botão celular resultante foi ressuspendido em 100 µL de tampão de ligação, e então incubado com 1 µL do anticorpo primário por 30 minutos a temperatura ambiente sob ausência de luminosidade. Mais uma vez, foi adicionado a cada tubo 1 mL de tampão de ligação, e submetido a centrifugação a 250g por 8 minutos. Posteriormente, estas amostras foram ressuspendidas em 100 µL de tampão de ligação, e incubadas com 1 µL do anticorpo secundário por 30 minutos a temperatura ambiente sob ausência de luminosidade. Logo após, adicionou-se 1 mL de tampão de ligação, e submeteu-se a centrifugação. As amostras foram ressuspendidas em 300 µL de tampão de ligação, e então analisadas por citometria de fluxo FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, EUA), onde 20.000 eventos referente a população de linfócitos CD5⁺ foram adquiridos.

6.1.8 Análise estatística

A distribuição de Gaussian foi confirmada pelo teste de Kolmogorov e Smirnov. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância para verificar as diferenças entre os grupos. Caso houvesse diferença significativa, procedeu-se o teste de Turkey-Kramer para comparações múltiplas entre as médias. A análise estatística foi realizada utilizando o

programa GraphPad Prisma 5.0 *software* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Foram consideradas significantes as análises que apresentaram $P < 0,05$.

6.2 RESULTADOS

6.2.1 Análise hematológica e sorodiagnóstico da LEB

Os resultados da sorologia demonstraram 25,00 % de animais reagentes ao sorodiagnóstico por imunodifusão em ágar gel, e 87,00 % dos animais reagentes ao sorodiagnóstico por ELISA. Os dados hematológicos dos 15 animais utilizados no presente estudo divididos uniformemente entre os diferentes grupos estão apresentados nas tabelas 04 e 05.

6.2.2 Proliferação de linfócitos

A proliferação basal de linfócitos dos 15 animais e sob os diferentes mitógenos e/ou estímulos está apresentada na tabela 15, assim como divididos nos seus respectivos grupos apresentados na tabela 16.

Tabela 15 - Média ($\pm$ desvio padrão) da proliferação de linfócitos dado pelo índice de proliferação celular e pela porcentagem de linfócitos responsivos com e sem estímulos – São Paulo – 2009

Proliferação	Basal	Con-A	LPS
Índice de Divisão	$0,127 \pm 0,038^a$	$0,251 \pm 0,102^b$	$0,136 \pm 0,027^{ac}$
% linfócitos responsivos	$12,09 \pm 3,61^a$	$22,30 \pm 7,82^b$	$12,54 \pm 2,81^a$

Letras distintas entre linhas indicam $P < 0,001$.

LPS: lipopolissáccido de *Escherichia coli* O127:B8 (25 $\mu\text{g/mL}$)

Con-A: concavalina-A type III (10 $\mu\text{g/mL}$)

Tabela 16 - Média ($\pm$ desvio padrão) da proliferação de linfócitos dado pelo índice de proliferação celular e pela porcentagem de linfócitos responsivos nos distintos grupos – São Paulo – 2009

Proliferação	Grupo	Basal	Con-A	LPS
Índice de Divisão	BLV ⁻	0,153 $\pm 0,029^a$	0,300 $\pm 0,141^a$	0,137 $\pm 0,023^{ab}$
	BLV ⁺ /PL ⁻	0,143 $\pm 0,014^a$	0,26 $\pm 0,006^a$	0,160 $\pm 0,018^a$
	BLV ⁺ /PL ⁺	0,083 $\pm 0,014^b$	0,193 $\pm 0,081^a$	0,110 $\pm 0,009^b$
	P	0,001	0,29	0,01
% linfócitos responsivos	BLV ⁻	14,63 $\pm$ 2,55 ^a	25,62 $\pm$ 9,35 ^a	12,65 $\pm$ 2,06 ^{ab}
	BLV ⁺ /PL ⁻	13,69 $\pm$ 1,09 ^a	24,12 $\pm$ 0,53 ^a	15,19 $\pm$ 1,46 ^b
	BLV ⁺ /PL ⁺	7,93 $\pm$ 1,55 ^b	17,16 $\pm$ 7,69 ^a	9,78 $\pm$ 1,09 ^b
	P	0,001	0,116	0,01

Letras distintas entre linhas indicam $P < 0,05$.

LPS: lipopolissáccido de *Escherichia coli* O127:B8 (25 μ g/mL)

Con-A: concavalina-A type III (10 μ g/mL)

BLV⁻: animais negativos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) sem alteração hematológica

BLV⁺/PL⁻: animais positivos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) sem alteração hematológica

BLV⁺/PL⁺: animais positivos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) manifestando linfocitose persistente (LP).

P: valor de significância

6.2.3 Apoptose de células CD5⁺

A porcentagem de linfócitos CD5⁺ do sangue periférico sofrendo apoptose (CD5⁺/annexin V-FITC⁺) foi de 0,56^a % ($\pm 0,34$), 0,60^a % ($\pm 0,35$) e 0,11^b % ($\pm 0,08$) ($P < 0,031$) nos grupos negativos, AL e LP, respectivamente. Do mesmo modo, como esperado, a viabilidade de células CD5⁺ lymphocytes (CD5⁺/annexin V-FITC⁻) foi significativamente maior no grupo LP (99,89 % $\pm 0,08$) ($P < 0,031$) comparado com o grupo negativo (99,44 % $\pm 0,34$) e AL (99,40 % $\pm 0,35$).

6.3 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou menor proliferação de linfócitos nos animais infectados pelo VLEB manifestando LP associado à redução da apoptose de células CD5⁺. De fato Debacq et al. (2003), Florins et al. (2007) e Florins et al. (2008) relataram menor expansão clonal de linfócitos associado a redução da morte celular nos animais infectados pelo VLEB manifestando LP. Curiosamente, Debacq et al. (2002) ao avaliarem a proliferação de linfócitos em ovelhas encontraram maior proliferação de linfócitos nos animais infectados pelo VLEB. Tal fato, enfatiza a importância da condição e modelo experimental envolvido. Ademais, Amills et al. (2002) também encontraram redução da expressão de interleucina- 2 (IL-2), que é a principal citocina envolvida com a proliferação linfocitária nestes animais.

Entretanto, foi proposto que a proliferação de linfócitos pode ocorrer em outros sítios (linfonodos, placas de payer ou medula óssea). Subsequentemente, Debacq et al. (2006) confirmaram este fato em ovelhas. Apesar das ovelhas apresentarem como modelo para o estudo da manifestação da LP na infecção pelo VLEB, esta espécie não é hospedeira natural do vírus visto que a transmissão não ocorre entre ovinos e bovinos. Adicionalmente a isto, a patogênese da infecção pelo VLEB apresenta mais aguda em ovinos, resultado do menor período de latência anterior ao desenvolvimento da LP. Além disso, quase todos os ovinos infectados sucumbem decorrentes da infecção pelo VLEB, o que ocorre em apenas cerca de 5 % dos bovinos. Uma das principais diferenças se refere á carga viral, onde a maioria dos bovinos que permanecem clinicamente saudáveis apresenta apenas 1 % ou menos dos leucócitos infectados, onde a carga viral permanece relativamente constante por longos períodos. Em ovinos, o número de células infectadas aumenta gradualmente até o início da leucemia. Deste modo, estas observações ilustram a diferença da indução da patogênese pelo VLEB nestas espécies (FLORINS et al., 2007).

Debacq et al. (2004) também demonstraram que o pico da proliferação de linfócitos ocorre logo anterior a soroconversão e a alta carga viral em ovinos. Desta forma, pode-se sugerir que a maior proliferação linfocitária em bovinos infectados pelo VLEB pode restringir apenas aos estágios iniciais da infecção, e posteriormente a LP persiste pela modulação do processo apoptótico pelo vírus como descrito por Schwartz-Cornil et al. (1997); Cantor et al. (2001), Florins et al. (2007) e Gillet et al. (2007).

Cantor et al. (2001) encontraram em bovinos infectados redução do processo apoptótico em animais infectados manifestando LP, sugerindo que embora a magnitude desta

redução seja relativamente pequena *in vitro*, os efeitos biológicos poderiam ser maiores. Takahashi et al. (2004) relataram que células B infectadas que não expressavam o VLEB eram menos propensas a sofrer apoptose *ex-vivo*.

Sabe-se que a persistência da infecção ocorre possivelmente associada à diferença da expressão de antígenos virais nas células infectadas que resulta na eliminação das células que os expressam (FLORINS et al., 2007; GILLET et al., 2007). Este fato é de extrema importância visto que logo após a infecção, a atividade da resposta humoral e citotóxica são capazes de abolir a replicação viral, permitindo apenas a expansão clonal das células portadoras do provírus, o que poderia justificaria a maior proliferação de linfócitos se restringir apenas aos estágios iniciais da infecção.

Por outro lado, a supressão viral *in vitro* por anticorpos anti-VLEB e por inibidores da PKC reduzem a proliferação celular (STONE et al, 2000). A expressão de proteínas virais é detectada em 5 a 15 % das CMSP de animais com LP sendo a maioria destas células correlacionadas com a inibição do processo apoptótico, corroborados pelo fato que a expansão clonal ocorre em apenas 3 % dos linfócitos que expressam o vírus (STONE et. al., 2000).

Desta forma, pode-se sugerir que o desenvolvimento da LP pode ser devido á redução do processo apoptótico pelas células B, e a maior proliferação linfocitária pode se restringir apenas ao estágio inicial do desenvolvimento da LP.

Capítulo 4. Quantificação da população de células B e das subpopulações de linfócitos T em bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina

7 INTRODUÇÃO

O VLEB é um retrovírus do tipo C, que é geneticamente e estruturalmente similar aos vírus linfotrópico de células T de primatas 1-5 (ex. HTLV-1 a 4 e STLV-1-2-3- e -5) (GILLET et al., 2007). A maioria dos bovinos infectados não apresentam sinais clínicos evidentes, e são referidos como alinfocitóticos (AL). No entanto, aproximadamente 30 % dos animais naturalmente infectados desenvolvem LP com aumento expressivo da população de linfócitos B, a maioria deles abriga o provírus. Além disso, menos de 5 % dos animais infectados desenvolvem linfossarcoma (SCHWARTZ et al., 1994; GILLET et al., 2007).

É bem conhecido que a LP é caracterizada pelo aumento no número de linfócitos B que são alvo do vírus. As células infectadas geralmente co-expressam a molécula de CD5. Outro marcador, a integrina CD11b define melhor a população celular infectada (GILLET et al., 2007). Entretanto, ao considerar as populações de células T nenhum consenso foi encontrado. Por exemplo, Gatei et al. (1989) relataram que animais infectados manifestando LP apresentavam redução da contagem total e da percentagem de células T CD4⁺ e células T CD8⁺. Ademais, Wu et al. (1999) verificaram que animais infectados com o VLEB com linfossarcoma também apresentavam redução da porcentagem da subpopulação de linfócitos T. Porém, Williams et al. (1988) encontraram aumento da contagem absoluta de linfócitos T em animais infectados pelo VLEB. Taylor et al. (1992) não descreveram diferença significativa nas subpopulações de linfócitos T circulantes em animais infectados manifestando LP.

Enfatiza-se, no entanto, que estes trabalhos discriminaram os grupos de animais infectados pelo VLEB, e os considerou sororreagentes negativos apenas pela IDGA. Sabe-se que apesar da alta sensibilidade deste teste, o mesmo apresenta baixa especificidade ao comparar com os ensaios imunoenzimáticos (ELISA), já que os animais com baixa titulação de anticorpos anti-VLEB geralmente se limitam a ser sororreagentes positivos no ELISA (CAMARGO et al., 2005).

O presente estudo buscou investigar a frequência e a contagem absoluta de linfócitos B e das subpopulações de linfócitos T por citometria de fluxo em bovinos infectados pelo VLEB com distintos perfis leucocitários conhecidos como AL e manifestando LP.

7.1 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1.1 Animais empregados

Foram coletadas amostras sanguíneas de 100 fêmeas bovinas adultas da raça holandesa, oriundas de rebanhos destinados à produção de leite localizado no Estado de São Paulo. Dentre estes animais, foram selecionados 15 animais subdivididos uniformemente conforme o resultado do sorodiagnóstico e do leucograma, em animais com sorodiagnóstico negativo, com sorodiagnóstico positivo alinfocitóticos, e animais com sorodiagnóstico positivo apresentando LP. Todos os animais incluídos no presente não apresentavam alterações clínicas evidentes, ou alterações hematológicas nos grupos de animais considerados negativos e AL. A persistência da linfocitose dos animais utilizados, no presente estudo, se deu após período de 72 dias, sendo considerados animais apresentando LP aqueles com contagem total de linfócitos superior a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ e contagem total de leucócitos superior a $15 \times 10^3/\mu\text{L}$ conforme critérios estabelecidos por Brenner et al. (2007).

7.1.2 Análise hematológica

A análise hematológica foi realizada por meio da mensuração pelo aparelho ABX[®] (Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, França), onde se obteve a contagem total de leucócitos por microlitro destes animais, que foi complementada pela contagem diferencial em esfregaços sanguíneos.

7.1.3 Sorodiagnóstico

O sorodiagnóstico foi realizado por kit comercial de imunodifusão em ágar gel (Tecpar[®], Curitiba, Brasil), e por kit comercial de ELISA (VRMD, Pullman, EUA, n°. cat. 284-5) através da detecção da glicoproteína gp51 do vírus da LEB, conforme recomendações do fabricante.

7.1.4 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas por gradiente de densidade Ficoll-Paque™ Plus® (GEHealthcare, EUA, n°. cat. 17-1440-03) (densidade 1,077 g/cm³) em fluxo laminar. Resumidamente, 10 mL de sangue periférico foram adicionadas a 10 mL de meio de cultura celular RPMI-1640® (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n°. cat. R7638) contendo 2 mM de L-glutamina (GIBCO™ Invitrogen, Grand Island, EUA, n°. cat. 21051-024) e 5×10^{-2} mM de 2-mercaptoetanol (Invitrogen, Grand Island, EUA, n°. cat. 21985-023). Esta solução celular resultante foi então cuidadosamente colocada sobre a fase de Ficoll, e submetida à centrifugação 700g por 40 minutos a 18° C. Após a centrifugação, a camada de células mononucleares, localizada na interfase entre a camada de Ficoll e constituintes do plasma, foi coletada e transferida para tubo cônico de 15 mL, que foi completado com RPMI-1640®, e submetido à centrifugação (250g por 8 minutos). Posteriormente, procedeu-se a lise das hemácias utilizando 10 mL de solução de cloreto de amônio (0,8 % de NH₄Cl, 0,1 mM EDTA). Logo após, foi realizada nova centrifugação (250g por 8 minutos), e o botão celular resultante ressuspensionado em 4 mL de RPMI-1640®.

7.1.5 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para avaliação quantitativa e qualitativa de células em suspensão. A transmissão ou a refração da luz pelas células são captadas por meio de detectores: *Side Scatter* (SSC) – sensível à dispersão lateral da luz, que fornece idéia de tamanho das células; *Forward Scatter* (FSC) – sensível à dispersão frontal da luz, que fornece parâmetros da granulosidade celular; e os detectores de fluorescência FL1 (verde), FL2 (alaranjada), e FL3 (vermelha). A fluorescência verde é mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL1), a fluorescência laranja a 585 ± 42 nm, e a fluorescência vermelha (FL2) acima de 670 nm.

Os resultados foram analisados pelo programa FlowJo®, versão 7.1.3. (Tree Star™, Inc., Ashland, EUA).

7.1.6 Quantificação das subpopulações de linfócitos

A quantificação das subpopulações de linfócitos do sangue total foi realizada utilizando anticorpos monoclonais primários: *mouse IgG1 anti-bovine CD3* (Linfócitos T) (VRMD, Pullman, EUA, n°. cat. MM1A), *mouse IgG2a anti-bovine CD4* (Linfócitos T CD4⁺) (VRMD, Pullman, EUA, n°. cat. IL-A11), *mouse IgM anti-bovine CD8α* (Linfócitos T CD8⁺) (VRMD, Pullman, EUA, n°. cat. BAQ111A), *mouse IgG2a anti-bovine CD5* (VRMD, Pullman, EUA, n°. cat. B29A), *mouse IgG1 anti-bovine CD11b* (VRMD, Pullman, EUA, n°. cat. MM12A), e anticorpos monoclonais secundários *goat anti-mouse IgG1* conjugado ao fluorocromo ficoeritrina-Cy5 (PE-Cy5) (Invitrogen, Carlsbad, EUA, n°. cat. M32018), *goat anti-mouse IgM* conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Invitrogen, Carlsbad, EUA, n°. cat. M31501), e *goat anti-mouse IgG2a* conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE) (Invitrogen, Carlsbad, EUA, n°. cat. M32204). Foi ainda utilizado o anticorpo *mouse anti-bovine CD21* (AbD Serotec, Oxford, Inglaterra, n°. cat. MCA1424PE) (Linfócitos B) conjugado ao fluorocromo PE. A quantificação das subpopulações de linfócitos T (CD3⁺ CD4⁺ e CD8⁺, e de linfócitos B (CD21) do CMSP também foi realizada.

Para tal, 100 µL de sangue periférico foram adicionados a quatro tubos, a saber: a) sem marcação, b) CD3, CD4, CD8; c) CD5, CD11b; d) CD21.

Inicialmente, procedeu-se a lise hipotônica das amostras do sangue periférico, e logo após submeteu-se a centrifugação a 250g por 8 minutos. Posteriormente, estas amostras foram ressuspensas em 1 mL de solução salina tamponada (SST), e novamente submetidas a centrifugação. O botão celular resultante foi ressuspendido em 100 µL de SST, e então incubado com 1 µL dos seus respectivos anticorpos primários ou 5 µL do anticorpo *mouse anti-bovine CD21* (excetuando-se os tubos sem marcação) por 30 minutos a temperatura ambiente sob ausência de luminosidade. Mais uma vez, foi adicionado a cada tubo 1 mL de SST, e submetido a centrifugação a 250g por 8 minutos. Posteriormente, estas amostras foram ressuspensas em 100 µL de SST, e incubadas com 1 µL dos seus respectivos anticorpos secundários (tubos b e c), por 30 minutos a temperatura ambiente sob ausência de luminosidade, excetuando-se neste caso os tubos sem marcação e o tubo d (CD21). Logo após, adicionou-se 1 mL de solução salina tamponada (SST), e submeteu-se a centrifugação. As amostras foram ressuspensas em 300 µL de SST, e então analisadas por citometria de fluxo FACSCaliburTM (Becton Dickinson Immunocytometry SystemTM, San Diego, EUA),

onde 20.000 eventos foram adquiridos das respectivas subpopulações de interesse, como demonstrado na figura 6.

Figura 6 - À esquerda, está representada a porcentagem de linfócitos T ($CD3^+$) do sangue total. À direita está representada a distribuição das células segundo os parâmetros de granulosidade (SSC) com a marcação do anticorpo anti-CD3, distribuída em escala logarítmica de 10^0 a 10^4 . A região R1 (gate) foi utilizada para delimitar a população de interesse, no caso a de linfócitos T ($CD3^+$). Assim, para a quantificação de linfócitos T, 20.000 eventos foram salvos dentro da subpopulação de interesse, no caso representado pela região R1. Após a delimitação da população de linfócitos T, determinou a porcentagem de células T auxiliares ($CD3^+/CD4^+$) e T citotóxicos ($CD3^+/CD8^+$), como demonstrado à direita. Desta forma, no quadrante superior esquerdo encontram-se as células T citotóxicas ($FL1^+$), no quadrante inferior direito ($FL2^+$) a subpopulação de células T auxiliares. O quadrante superior direito indica as células T $CD4^+/CD8^+$. Já no quadrante inferior esquerdo tem-se as células T $CD4^-/CD8^-$ - São Paulo – 2009

A contagem total das diferentes subpopulações celulares se deu pela multiplicação da porcentagem de cada subpopulação avaliada na citometria de fluxo pela contagem total de leucócitos encontrada na avaliação hematológica.

7.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, foi verificada a normalidade e a homocedasticidade dos dados. Para a análise de variância foi utilizada a análise de variância não paramétrica e o teste de Turkey. Todos os processamentos foram realizados utilizando-se do programa GraphPad Prisma 5.0[®] (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

7.2 RESULTADOS

7.2.1 Análise hematológica e sorodiagnóstico da LEB

Os resultados da sorologia demonstraram 25,00 % de animais reagentes ao sorodiagnóstico por IDGA, e 87,00 % dos animais reagentes ao sorodiagnóstico por ELISA. Os dados hematológicos dos 15 animais utilizados no presente estudo divididos uniformemente entre os diferentes grupos estão apresentados nas tabelas 4 e 5.

7.2.2 Fenotipagem de linfócitos do sangue periférico

A fenotipagem da população de B e de linfócitos T, assim como das subpopulações de linfócitos T auxiliares e citotóxicos, e da população de linfócitos CD5⁺, e da subunidade da β_2 -integrina CD11b⁺ nos leucócitos do sangue periférico e das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) nos diferentes grupos estão apresentados nas tabelas 18, 19 e 20.

Tabela 18 - Porcentagem de células B (CD21⁺), linfócitos T (CD3⁺), linfócitos T auxiliares (CD3⁺/CD4⁺), linfócitos T citotóxicos (CD3⁺/CD8⁺) e de células CD5⁺ e CD11b⁺, e a proporção de células T/ células B e de linfócitos T auxiliares/ T citotóxicos identificadas por anticorpos monoclonais pela citometria de fluxo no sangue periférico dos animais considerados negativos para LEB (BLV⁻), positivos alinfocitóticos (BLV⁺/PL⁻) e positivos manifestando linfocitose persistente (BLV⁺/PL⁺) – São Paulo – 2009

%	BLV ⁻	BLV ⁺ /PL ⁻	BLV ⁺ /PL ⁺
CD21⁺	20,82 $\pm$ 3,65 ^{a**}	23,40 $\pm$ 8,25 ^{a*}	41,82 $\pm$ 6,30 ^b
CD3⁺	26,35 $\pm$ 4,21 ^{a**}	24,69 $\pm$ 4,78 ^{a*}	15,27 $\pm$ 3,53 ^b
CD3⁺/CD21⁺	1,27 $\pm$ 0,12 ^a	1,14 $\pm$ 0,35 ^a	0,37 $\pm$ 0,08 ^{b***}
CD3⁺/CD4⁺	8,50 $\pm$ 2,29 ^a	8,48 $\pm$ 2,65 ^a	3,95 $\pm$ 1,36 ^{b*}
CD3⁺/CD8⁺	9,04 $\pm$ 3,80 ^a	11,10 $\pm$ 3,70 ^a	6,47 $\pm$ 2,26 ^a
CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺	0,41 $\pm$ 0,10 ^a	0,46 $\pm$ 0,20 ^a	0,41 $\pm$ 0,22 ^a
CD4⁺/CD8⁺	1,07 $\pm$ 0,43 ^a	0,86 $\pm$ 0,31 ^a	0,70 $\pm$ 0,40 ^a
CD5⁺/CD11b⁻	28,85 $\pm$ 5,79 ^a	26,98 $\pm$ 4,67 ^a	29,89 $\pm$ 10,63 ^a
CD5⁺/CD11b⁺	22,50 $\pm$ 9,57 ^a	26,01 $\pm$ 6,15 ^{ab}	37,56 $\pm$ 9,88 ^{b*}
CD11b⁺/CD5⁻	37,84 $\pm$ 3,38 ^a	36,74 $\pm$ 2,16 ^a	26,10 $\pm$ 5,79 ^{b**}

Valores médios $\pm$ desvio padrão

Letras diferentes entre as linhas indicam P < 0,05. * P > 0,05. ** P > 0,01. *** P > 0,001.

BLV⁻: animais negativos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) sem alteração hematológica

BLV⁺/PL⁻: animais positivos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) sem alteração hematológica

BLV⁺/PL⁺: animais negativos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) manifestando linfocitose persistente (LP).

CD3⁺/CD21⁺: proporção entre células T/ células B

CD3⁺/CD4⁺/CD8⁺: células T que co-expressam CD4⁺ e CD8⁺.

CD4⁺/CD8⁺: proporção entre células T CD4⁺/ células T CD8⁺

Tabela 19 - Valores absolutos ($10^3/\mu\text{L}$) de células B ($\text{CD}21^+$), linfócitos T ($\text{CD}3^+$), linfócitos T auxiliares ($\text{CD}3^+/\text{CD}4^+$), linfócitos T citotóxicos ($\text{CD}3^+/\text{CD}8^+$) e de células $\text{CD}5^+$ e $\text{CD}11b^+$ identificadas por anticorpos monoclonais pela citometria de fluxo no sangue periférico dos animais considerados negativos para LEB (BLV^-), positivos alinfocitóticos (BLV^+/PL^-) e positivos manifestando linfocitose persistente (BLV^+/PL^+) – São Paulo – 2009

%	BLV^-	BLV^+/PL^-	BLV^+/PL^+
$\text{CD}21^+$	$2,30 \pm 0,27^a$	$2,47 \pm 0,82^a$	$10,31 \pm 4,77^{b*}$
$\text{CD}3^+$	$2,92 \pm 2,26^a$	$2,62 \pm 0,44^a$	$3,68 \pm 1,58^a$
$\text{CD}3^+/\text{CD}4^+$	$0,95 \pm 0,28^a$	$0,91 \pm 0,32^a$	$0,87 \pm 0,14^a$
$\text{CD}3^+/\text{CD}8^+$	$0,99 \pm 0,36^a$	$1,17 \pm 0,31^a$	$1,65 \pm 1,10^a$
$\text{CD}3^+/\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$	$0,05 \pm 0,02^a$	$0,05 \pm 0,02^a$	$0,10 \pm 0,05^a$
$\text{CD}5^+/\text{CD}11b^-$	$3,35 \pm 0,79^a$	$2,90 \pm 0,63^a$	$8,95 \pm 3,67^{b*}$
$\text{CD}5^+/\text{CD}11b^+$	$2,51 \pm 1,06^a$	$2,75 \pm 0,51^a$	$8,95 \pm 3,67^{b**}$
$\text{CD}11b^+/\text{CD}5^-$	$4,24 \pm 0,62^a$	$3,93 \pm 0,45^a$	$6,10 \pm 1,63^{b*}$

Valores médios $\pm$ desvio padrão

Letras diferentes entre as linhas indicam $P < 0,05$. * $P > 0,05$. ** $P > 0,01$. *** $P > 0,001$.

BLV^- : animais negativos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) sem alteração hematológica

BLV^+/PL^- : animais positivos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) sem alteração hematológica

BLV^+/PL^+ : animais negativos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) manifestando linfocitose persistente (LP).

$\text{CD}3^+/\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$: células T que co-expressam $\text{CD}4^+$ e $\text{CD}8^+$.

Tabela 20 - Porcentagem de células B ($\text{CD}21^+$), linfócitos T ($\text{CD}3^+$), linfócitos T auxiliares ($\text{CD}3^+/\text{CD}4^+$) e linfócitos T citotóxicos ($\text{CD}3^+/\text{CD}8^+$) e a proporção de células T/ células B e de linfócitos T auxiliares/ T citotóxicos identificadas por anticorpos monoclonais pela citometria de fluxo das células mononucleares do sangue periférico dos animais considerados negativos para LEB (BLV^-), positivos alinfocitóticos (BLV^+/PL^-) e positivos manifestando linfocitose persistente (BLV^+/PL^+) – São Paulo – 2009

%	BLV^-	BLV^+/PL^-	BLV^+/PL^+
$\text{CD}21^+$	$31,68 \pm 6,09^{a***}$	$42,02 \pm 10,84^{a*}$	$59,18 \pm 6,96^b$
$\text{CD}3^+$	$35,57 \pm 5,08^{a***}$	$25,62 \pm 2,01^{b(**)}$	$16,67 \pm 4,71^c$
$\text{CD}3^+/\text{CD}21^+$	$1,15 \pm 0,25^{a***}$	$0,65 \pm 0,23^{b(**)}$	$0,29 \pm 0,12^c$
$\text{CD}3^+/\text{CD}4^+$	$12,79 \pm 1,74^{a***}$	$9,89 \pm 1,54^{a*}$	$5,75 \pm 2,67^b$
$\text{CD}3^+/\text{CD}8^+$	$9,65 \pm 2,50^{a**}$	$7,97 \pm 1,46^{a*}$	$4,31 \pm 1,19^b$
$\text{CD}3^+/\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$	$1,44 \pm 0,69^a$	$1,57 \pm 0,40^a$	$1,09 \pm 0,81^a$
$\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$	$1,43 \pm 0,50^a$	$1,28 \pm 0,36^a$	$1,21 \pm 0,45^a$

Valores médios $\pm$ desvio padrão

Letras diferentes entre as linhas indicam $P < 0,05$. * $P > 0,05$. ** $P > 0,01$ entre os animais BLV^- e BLV^+/PL^- . *** $P > 0,001$.

BLV^- : animais negativos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) sem alteração hematológica

BLV^+/PL^- : animais positivos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) sem alteração hematológica

BLV^+/PL^+ : animais negativos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) manifestando linfocitose persistente (LP).

$\text{CD}3^+/\text{CD}21^+$: proporção entre células T/ células B

$\text{CD}3^+/\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$: células T que co-expressam $\text{CD}4^+$ e $\text{CD}8^+$.

$\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$: proporção entre células T $\text{CD}4^+$ / células T $\text{CD}8^+$

7.3 DISCUSSÃO

É bem documentado que animais infectados pelo VLEB manifestando LP apresentam aumento da população de linfócitos B (GILLET et al., 2007). Desta forma, o presente estudo concordou o envolvimento das células B ($CD21^+$) no desenvolvimento da LP. Além disso, marcadores de células infectadas como a expressão de $CD5^+$ e $CD11b^+$ geralmente apresentam-se aumentados como pode ser observado no presente estudo. Isto se deve a modulação do processo apoptótico pelo VLEB e seu tropismo pelas células B, em especial aquelas que co-expressam os marcadores CD5 e CD11b. Embora, saiba-se que o VLEB pode infectar células $CD5^-$ e $CD11b^-$, assim como células T citotóxicas ($CD3^+/CD8^+$), monócitos e granulócitos (SCHWARTZ et al., 1994; FLORINS et al., 2007).

Assim, devido ao significativo aumento da população de linfócitos B, a porcentagem de outras populações celulares como as células T diminuiu como demonstrado no presente estudo, em especial a população de linfócitos T auxiliares, população que não é infectada pelo VLEB. Deste modo, a proporção entre células B e T pode ser utilizada como indicador do desenvolvimento da LP.

O valor absoluto das subpopulações de linfócitos T, no caso linfócitos T citotóxicos e T auxiliares, não foi alterada no presente estudo. Similarmente, Taylor et al. (1992) não observaram alterações das subpopulações de linfócitos T em bovinos infectados pelo VLEB manifestando LP.

Entretanto, alguns autores apontam para o aumento da população de linfócitos T nos animais infectados pelo VLEB (GATEI et al., 1989; WU et al., 1999), enquanto outros relataram redução desta população celular (WILLIAMS et al., 1988). No presente estudo, um discreto aumento, não significativo do número absoluto de linfócitos T $CD8^+$ foi encontrado. Embora, o mesmo não pode ser predito para a população de linfócitos T $CD4^+$. Sabe-se que células T $CD8^+$ podem abrigar o VLEB, embora o mesmo não ocorra na população de células T $CD4^+$. Desta maneira, pode-se inferir que este discreto aumento da população de células T $CD8^+$ deve-se provavelmente a modulação do processo apoptótico nas células infectadas. Este fato torna-se mais evidente nos animais infectados manifestando LP, já que estes apresentam alta carga viral que nem sempre é observada nos animais AL (JULIARENA et al., 2007).

Desta forma, o presente trabalho apontou para aumento da população de linfócitos B, com concomitante redução da porcentagem da população de células T, em especial da subpopulação de linfócitos T auxiliares. Isto pode ser reflexo da modulação do processo

apoptótico que está correlacionado com ausência e/ou redução da expressão viral nas células infectadas resultando na evasão da resposta humoral e citotóxica do hospedeiro levando a persistência da infecção e/ou progressão da doença (GILLET et al., 2007).

Salienta-se ainda que ao considerar a redução da transmissão da LEB, visto a dificuldade para a sua erradicação, a eliminação de animais com maior risco de transmissão desta enfermidade deve ser considerada, fato importante ao considerar os animais manifestando LP que apresentam aumento da população de linfócitos B e concomitante abrigam maior porcentagem de células infectadas (maior número de cópias provirais por micrograma de ADN de CMSP), e consequentemente apresentam maior risco de transmissão desta doença (JULIARENA et al., 2007).

8 CONCLUSÕES

- A infecção pelo VLEB pode ser associada ao decréscimo da atividade das enzimas GSH-Px e SOD. Entretanto, as atividades da GSH-Px e SOD não podem ser associadas ao aumento de linfócitos B resultante da manifestação da linfocitose persistente em vacas leiteiras. No entanto, os marcadores de estresse oxidativo e a atividade antioxidante total não apresentaram alterados devido á infecção pelo VLEB.
- O desenvolvimento da LP deve-se á redução do processo apoptótico dos linfócitos B, e a maior proliferação linfocitária pode se limitar apenas ao estágio inicial do desenvolvimento da LP.
- A função fagocítica e a produção intracelular de peróxido de hidrogênio de PMN nao apresentou alterada nos bovinos naturalmente infectados pelo VLEB manifestando ou não LP.
- O presente estudo apontou para significativo aumento da população de linfócitos B e concomitante aumento de células $CD5^{+}$ e $CD11b^{+}$. Ademais, pode-se observar inversão da população da proporção de células T /células B nos animais infectados manifestando LP, que se deve principalmente ao significativo aumento da população das células B, e a redução da porcentagem de linfócitos T, em especial a de linfócitos T auxiliares. No entanto, a infecção pelo VLEB não pode ser associada com alteração da contagem das subpopulações de células T.

REFERÊNCIAS

ACHACHI, A.; FLORINS, A.; GILLET, N.; DEBACQ, C.; URBAIN, P.; FOUTSOP, G.M.; VANDERMEERS, F.; JASIK, A.; REICHERT, M.; KERKHOLFS, P.; LAGNEAUX L.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 10309 - 10314, 2005.

AKAIKE, T. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. **Reviews in Medical Virology**, v. 11, n. 02, p. 87 - 101, 2001.

ALCARAZ, T. S.; KERKHOLFS, P.; REICHERT, M.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Involvement of glutathione as a mechanism of indirect protection against spontaneous *ex vivo* apoptosis associated with bovine leukemia virus. **Journal of Virology**, v. 78, n. 12, p. 6180 - 6189, 2004.

ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 128, p. 463 - 499, 2000.

AMILLS, M.; NORIMINE, J.; OLMSTEAD, C. A.; LEWIN, H. A. Cytokine mRNA expression in B cells from bovine leukemia virus-infected cattle with persistent lymphocytosis. **Cytokine**, v. 28, n. 1, p. 25-28, 2004.

AQUARO, S.; MUSCOLI, C.; RANAZZI, A.; POLLICITA, M.; GRANATO, T.; MASUELI, L.; MODESTI, A.; PERNO, C-F.; MOLLACE, V. The contribution of peroxynitrite generation in HIV replication in human primary macrophages. **Retrovirology**, 4: 76, 2007.

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. 05, p. 390-397, 2008.

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.

BAETEN, J. M.; MOSTAD, S. B.; HUGHES, M. P.; OVERBAUGH, J.; BANKSON, D. D.; MANDALIYA, K.; NDINYA-ACHOLA, J. O.; BWAYO, J. J.; KREISS, J. K. Selenium deficiency is associated with shedding of HIV-1-infected cells in the female genital tract. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 26, p. 360-364, 2001.

BALANSKY, R. M.; ARGINOVA, R. M. Sodium selenite inhibition of the reproduction of some oncogenic RNA-viruses. **Experimentia**, v. 37, p. 1194-1195, 1981.

BAUM, M. K.; SHOR-POSNER, G.; LAI, S. High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes Human Retrovirology**, v. 15, p. 370-374, 1997.

BECK, M. E. Selenium and Vitamin E Status: Impact on Viral Pathogenicity. **Journal of Nutrition**, v. 137, p.1338-1340, 2007.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, n. 5, p. 882-888, 1963.

BONDZIO, A.; ABRAHAM-PODGORNIK, A.; BLANKENSTEIN, P.; RISSE, S. Involvement of intracellular Ca^{2+} in the regulation of bovine leukemia virus expression. **Biological Chemistry**, v. 382, p. 407-416, 2001.

BONDZIO, A.; BLANKENSTEIN, P.; RISSE, S. Effects of hydrogen peroxyde on bovine leukemia virus expression. **Biological Chemistry**, v. 384, p. 1063-1072, 2003.

BONIZZI, G.; PIETTE, J.; SCHOONBROODT, S.; GREIMERS, A.; HAVARD, L.; MELVILLE, M. P.; BOURS, V. Reactive oxygen intermediate-dependent NF- κ B activation by interleukin-1 β requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 1950-1960, 1999.

BOUZAR, A. B.; BOXUS, M.; FLORINS, A.; FRANÇOIS, C.; REICHERT, M.; WILLEMS, L. Reduced levels of reactive oxygen species correlates with inhibition of apoptosis, rise in thioredoxin expression and increase bovine leukemia virus proviral loads. **Retrovirology**, 6: 102, 2009.

BRÉCHARD, S.; TSCHIRHART, E.J. Regulation of superoxide production in neutrophils; role of calcium influx. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 05, p. 1223-1237, 2008.

BREITKREUTZ, R.; HOLM, S.; PITACK, N.; BEICHERT, M.; BABYLON, A.; YODOI, J.; DRÖGE, W. Massive loss of sulfur in HIV infection. **AIDS Research and Human Retroviroses**, v. 16, p. 203 - 209, 2000.

BRENNER, J.; AVIDAR, J.; LAHAV, D. Bovine leukemia virus infection should also be considered in the differential diagnosis of nonspecific clinical manifestations. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 62, n. 1, p. 30-31, 2007.

CAMARGO, M. F.; OLIVEIRA JUNIOR, A. C.; DA CRUZ, J. C. M.; LESSA, L. M.; ROCHA, M. A.; STANCEK, D.; PELLEGRIN, A. E.; REIS, J. K. P.; LEITE, R. C. Testes de diagnóstico para o vírus da leucemia bovina. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 12, n. 1/3, p. 149-150, 2005.

CANTOR, G. L.; PRITCHARD, S. M.; DEQUIET, F.; WILLEMS, L.; KETTMAN, R.; DAVIS, W. C. CD5 is associated from the B-cell receptor in B cells from bovine leukemia virus-infected, persistently lymphocytotic cattle: consequences to B-cell receptor-mediated-apoptosis. **Journal of Virology**, v. 75, n. 4, p. 1689-1696, 2001.

CHO, H. Y.; IMAMI, F.; MILLER-DEGRAFF, L.; WALTERS, D.; MELENDI, G. A.; YAMAMOTO, M.; POLACK, F. P.; KLEEBERGER, S. T. Antiviral activity of Nrf-2 in a murine model of respiratory syncytial vírus (RSV) disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 79, n. 2, p. 138-150, 2008.

CLARKE, P.; TYLER, K. L. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 144-155, 2009.

COHEN, I.; BOYA, P.; ZHAO, L.; MÉTIVIER, D.; ANDREAU, K.; PERFETTINI, J.-L.; WEAVER, J. G.; BADLEY, A.; TAYLOR, E. W.; KROEMER, G. Anti-apoptotic activity of the glutathione peroxidase homologue encoded by HIV-1. **Apoptosis**, v. 9, p. 181-192, 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.

DEBACQ, C.; ASQUITH, B.; REICHERT, M.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Reduced cell turnover in bovine leukemia virus-infected, persistently lymphocytotic cattle. **Journal of Virology**, v. 77, n. 24, p. 13073-13083, 2003.

DEBACQ, C.; SANCHEZ-ALCARAZ, M. T.; MORTREUX, F.; KERKHOLFS, P.; KETTMAN, R.; WILLEMS, L. Reduced proviral loads during primo-infection of sheep by bovine leukemia virus attenuated mutants. **Retrovirology**, 1:31, 2004.

DEBACQ, C.; GILLET, N.; ASQUITH, B.; SANCHEZ-ALCARAZ, M.T.; FLORINS, A.; BOXUS, M.; SCHWARTZ-CORNIL, I.; BONNEAU, M.; JEAN, G.; KERKHOF, P.; HAY, J.; THÉWIS, A.; KETTMAN, R.; WILLEMS, L. Peripheral blood B-cell death compensates for excessive proliferation in lymphoid tissues and maintains homeostasis in bovine leukemia virus-infected sheep. **Journal of Virology**, v. 80, n. 19, p. 9710-9719, 2006.

DELMAS-BEAUVIEX, M. C.; PEUCHANT, E.; COUCHOURON, A.; CONSTANS, J.; SERGEANT, C.; LENG, B.; CONRI, C.; CLERC, M. The enzymatic antioxidant system in blood and glutathione status in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients: effects of supplementation with selenium or beta-carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, 101-107, 1996.

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

DRAIN, P. K.; KUPKA, R.; MUGUSI, F.; FAWZI, W. W. Micronutrients in HIV-positive persons receiving highly active antiretroviral therapy. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 2, p. 333-345, 2007.

DRÖGE, W.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; MIHM, S.; GALTER, D.; SCHENK, H.; ECK, H. P.; ROTH, S.; GMÜNDER, H. Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology. **FASEB Journal**, v. 8, p. 1131-1138, 1994.

DRÖGE, W.; HOLM, E. Role of cysteine and glutathione in HIV infection and other diseases associated with muscle wasting and immunological dysfunctions. **FASEB Journal**, v. 11, p. 1077-1089, 1997.

DRÖGE, W.; BREITKREUTZ, R. Glutathione and the immune system. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 59, p. 595-600, 2000.

DWORKIN, B. M.; ROSENTHAL, W. S.; WORMSER, G. P.; WEISS, L.; NUNEZ, M.; JOLINE, C.; HERP, A. Abnormalities of blood selenium and glutathione peroxidase activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome and AIDS-related complex. **Biological Trace Element Research**, v. 15, p. 167-177, 1988.

DWORKIN, B. M. Selenium deficiency in HIV infection and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Chemico-Biological Interactions**, v. 91, p. 181-186, 1994.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, n. 186, p. 407-421, 1990.

FADDEN, G. Even Viruses can learn to cope with stress. **Science**, v. 279, n. 5347, p. 40-41, 1998.

FITZGERALD, S. D.; SLEDGE, D. G.; MAES, R.; KIUPEL, M. Coinfection of a cow with bovine leukemia virus and *Mycobacterium bovis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 6, p. 878-882, 2009.

FLORINS, A.; GILLET, N.; ASQUITH, B.; BOXUS, M.; BURTBEAU, C.; TWIZERE, J-C.; URBAIN, P.; VANDERMEERS, F.; DEBACQ, C.; SANHEZ-ALCARAZ, M. T.; SCHWARTZ-CORNIL, I.; KERKHOF, P.; JEAN, G.; THÉWIS, A.; HAY, J.; MORTREUX, F.; WATTEL, E.; REICHERT, M.; BURNY, A.; KETTMAN, R.; BANGHAM, C.; WILLEMS, L. Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 1520-1531, 2007.

FLORINS, A.; BOXUS, M.; VANDERMEERS, F.; VERLARTEN, O.; BOUZAR, A-B.; DEFOICHE, J.; HUBAUX, R.; BURNY, A.; KETTMAN, 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.

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 Leukemia Virus-infected Cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 23, n. 1/2, p. 139-147, 1989.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

HANCOCK, J. T.; DESIKAN, R.; NEILL, S. J. Role of reactive oxygen species in cell signaling pathways. **Biochemical Society Transactions**, v. 29, p. 345-350, 2001.

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.

HAWKINS, E. D.; HOMMEL, M.; TURNER, M. L.; BATTYE, F. L.; MARKHAM, J. F.; HODGKIN, P. D. Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2057-2067, 2007.

JENSEN, W.A.; WICKS-BEARD, B.; COCKERELL, G. L. Inhibition of protein kinase C results in decreased expression of bovine leukemia virus. **Journal of Virology**, v. 66, n. 7, p. 4427-4433, 1992.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 8, p. 1865-1879, 2006.

JULIARENA, M. A.; GUTIERREZ, S. E.; CERIANI, C. Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 11, p. 1220-1225, 2007.

KACZMARCZYK, E.; BOJAROJC-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 Genetics**, v. 46, n. 1, p. 59-67, 2005.

KAMPEN, A. H.; TULLERSRUD, 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, 2004.

KHALILI, H.; SOUDBAKHSH, A.; HAJIABDOLBAGHI, M.; DASHTI-KHAVIDAKI, S.; POORZARE, A.; SAEEDI, A. A.; SHARIFIFAR, R. Nutritional status and serum zinc and selenium levels in Iranian HIV infected individuals. **BMC Infectious Diseases**, 8: 165, 2008.

KALEBIC, T.; KINTER, A.; POLI, G.; ANDERSON, M. E.; MEISTER, A.; FAUCI, A. S. Suppression of human immunodeficiency virus expression in chronically monocytic cells by glutathione. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 986-990, 1991.

KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M.; DeLEO, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1337-1344, 2003.

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.

LANZILLOTTI, J. S.; TANG, A. M. Micronutrients and HIV disease: a review pre- and post-HAART. **Nutrition and Clinical Care**, v. 8, p. 16-23, 2005.

LASSOUED, S.; AMEUR, R. B.; AYADI, W.; GARGOURI, B.; MANSOUR, R. B.; ATTIA, H. Epstein-Barr virus induces an oxidative stress during early stages of infection in B lymphocytes, epithelial, and lymphoblastoid cell lines. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 313, p. 179-186, 2008.

LEFF, J. A.; OPPEGARD, M. A.; CURIEL, T. J.; BROWN, K. S.; SCHOOLEY, R. T.; REPINE, J. E. Progressive increase in serum catalase activity in advancing human immunodeficiency virus infection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, p. 143-149, 1992.

LEGRAND-POELS, S.; VIARA, D.; PINCEMAIL, J.; VAN DER VORST, A.; PIETTE, J. Activation of Human Immunodeficiency virus type-1 by oxidative stress. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 6, p. 1389-1397, 1990.

LEI, X. G.; CHENG, W-H.; MCCLUNG, J. P. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. **Annual Review of Nutrition**, v. 27, p. 41-61, 2007.

LOS, M.; KHAZAIE, K.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; BAEUERLE, P. A.; SCHIRRMACHER, V.; CHLICHIA, K. Human T cell leukemia virus-I (HTLV-I) Tax-mediated apoptosis in activated T cells requires an enhanced intracellular prooxidant state. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 6, p. 3050-3055, 1998.

LYONS, A. B.; PARISH, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 171, p. 131-137, 1994.

- LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p.147-154, 2000.
- MATSUOKA, M.; JEANG, K. T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 270-280, 2007.
- MULLER, F.; SVARDAL, A. M.; NORDOY, I.; BERGE, R. K.; AUKRUST, P.; FROLAND, S. S. Virological and immunological effects of antioxidant treatment in patients with HIV infection. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, p. 905-914, 2000.
- ONODERA, T.; SAKUDO, A.; WU, G.; SAEKI, K. Bovine Spongiform Encephalopathy in Japan: History and Recent Studies on Oxidative Stress in Prion Diseases. **Microbiology and Immunology**, v. 50, n. 8, p. 565-578, 2006.
- PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.
- PUGLIESE, A.; VIDOTTO, V.; BELTRAMO, T.; TORRE, D. Phagocytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 8, p. 889-895, 2005.
- PYEON, D.; O'REILLY, K. L.; SPLITTER, G. A. Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing or persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5706-5710, 1996.
- PYO, C. W.; YANG, Y. L.; YOO, N. K.; CHOI, S. Y. Reactive oxygen species activate HIV long terminal repeat via post-translational control of NF-kappaB. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 376, n. 1, p. 180-185, 2008.
- RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, v. 256, p. 233-241, 2000.
- ROEDERER, M.; ELA, S. W.; STAAL, F. J. T.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. N-acetylcysteine: a new approach to anti-HIV therapy. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 08, p. 209-217, 1992.
- SAGATA, N.; YASUNAGA, T.; TSUZUKU-KAWAMURA, J.; OHISHI, K.; OGAWA, Y.; IKAWA, Y. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to others retroviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 677-681, 1985.
- SHISLER, J. L.; SENKEVICH, T. G.; BERRY, M. J.; MOSS, B. Ultraviolet-induced cell death blocked by a selenoprotein from a human dermatotropic poxvirus. **Science**, v. 279, p. 102-105, 1998.

SCHRECK, R.; RIEBER, P.; BAUERLE, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. **EMBO Journal**, v. 10, n. 8, 2247-2258, 1991.

SCHULZE-OSTHOFF, K.; BAKER, A. C.; VANHAESEBROECK, B.; BAYAERT, R.; JACOB, W. A.; FIERS, W. Cytotoxicity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. **Journal of Biology Chemistry**, v. 167, p. 5317-5323, 1992.

SCHWARZ, K. B. Oxidative stress during viral infections: A review. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, p. 641-649, 1996.

SCHWARTZ, I.; BENSAD, 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.

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

STEPHENSEN, C. B.; MARQUIS, G. S.; DOUGLAS, S. D.; KRUZICH, L. A.; WILSON, C. M. Glutathione, glutathione peroxidase, and selenium status in HIV-positive and HIV-negative adolescents and young adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 1, p. 173-181, 2007.

STONE, D. M.; NORTON, L. K.; DAVIS, W. C. Spontaneously proliferating lymphocytes from bovine leukaemia virus-infected, lymphocytotic cattle are not the virus-expressing lymphocytes, as these cells are delayed in G₀/G₁ of the cell cycle and are spared from apoptosis. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 971-981, 2000.

SWITZER, W. M.; SALEMI, M.; QARI, S. H.; JIA, H.; GRAY, R. R.; KATZOURAKIS, A.; MARRIOTT, S. J.; PRYOR, K. N.; WOLFE, N. D.; BURKE, D. S.; FOLKS, T. M.; HENEINE, W. Ancient, independent evolution and distinct molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 4. **Retrovirology**, v. 6, p. 9, 2009.

TAKAHASHI, M.; TAJIMA, S.; TAKESHIMA, S.; KONNAI, S.; YIN, S. A.; OKADA, K.; DAVIS, W. C.; AIDA, Y. Ex vivo of peripheral blood mononuclear cells in sheep induced by bovine leukemia virus (BLV) mainly occurs in CD5 B cells that express BLV. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 6, p. 584-595, 2004.

TAYLOR, B. C.; STOTT, J. L.; THURMOND, M. A.; PICANSO, J. P. Alteration in Lymphocyte subpopulations in bovine leukosis virus-infected cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 31, p. 35-47, 1992.

TAYLOR, E. W.; NADIMPALLI, R. G.; RAMANATHAN, C. S. Genomic structures of viral agents in relation to the biosynthesis of selenoproteins. **Biological Trace Element Research**, v. 56, p. 63-91, 1997.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology - Lung cellular and Molecular Physiology**, v. 279, p. 1005-1028, 2000.

TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. The importance of Glutathione in human disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57: 145 - 155, 2003.

TRAININ, Z.; BRENNER, J.; MEIROM, R.; UNGAR-WARON, H. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on immunological state of cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, p. 39-51, 1996.

TREITINGER, A.; SPADA, C.; VERDI, J. C.; MIRANDA, A. F. B.; OLIVEIRA, O. V.; MORIEL, P.; ABDALLA, D. S. P. Decreased antioxidant defence in individuals infected by the human immunodeficiency virus. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, p. 642-647, 2000.

TREITINGER, A.; SPADA, C.; MASOKAWA, I. Y.; VERDI, J. C.; VAN DER SANDER SILVEIRA, M.; LUIS, M. C.; REIS, M.; FERREIRA, S. I.; ABDALLA, D. S. P. Effect of N-acetyl-L-cysteine on lymphocyte apoptosis, lymphocyte viability, TNF- α and IL-8 in HIV-infected patients undergoing anti-retroviral treatment. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 363-371, 2004.

TRUONG-TRAN, A. Q.; CARTER, J.; RUFFIN, R. E.; ZALENSKI, P. D. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. **Biometals**, v. 14, p. 315-330, 2001.

VANLEEUEWEN, J. A.; HADDAD, J. P.; DOHOO, I. R.; KEEFE, G. P.; TIWARI, A.; SCOTT, H. M. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, n. 2-3, p. 129-138, 2009.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin-V. **Journal of Immunology Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.

WALKER, A. F.; LUMSDEN, J. H.; STIRTZINGER, T. Neutrophil function in sheep experimentally infected with bovine leukemia virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 14, p. 67-76, 1987.

WEINGARTEN, R.; SKLAR, L. A.; MATHISON, J. C.; OMIDI, S. A.; AINSWORTH, T.; SIMON, S.; ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S. Interaction of lipopolysaccharide with neutrophils in blood. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 53, p. 518-523, 1993.

WILLIAMS, D. L.; AMBRORSKI, G. F.; DAVIS, W. C. Enumeration of T and B cells lymphocytes in bovine leukemia virus-infected cattle, using monoclonal antibodies. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 7, p. 1098-1103, 1988.

WOOLLIAMS, J. A.; WIENER, G.; ANDERSON, P. H.; McMURRAY, C. H. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 34, n. 3, p. 253-256, 1983.

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.

YAKOBSON, B.; BRENNER, J.; UNGAR-WARON, H.; TRAININ, Z. Cellular immune response cytokine expression during the initial stage of bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 197-208, 2000.

ZHAO, L.; COX, A. G.; RUZIKA, J. A.; BHAT, A. A.; ZHANG, W.; TAYLOR, E. W. Molecular modeling and *in vitro* activity of an HIV-1-encoded glutathione peroxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6356-6361, 2000.