Bruna Parapinski dos Santos

Influência do vírus da artrite encefalite caprina no imunograma sanguíneo e lácteo de cabras naturalmente infectadas

São Paulo

2012

Bruna Parapinski dos Santos

Influência do vírus da artrite encefalite caprina no imunograma sanguíneo e lácteo de cabras naturalmente infectadas

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

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera

São Paulo

2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2619
FMVZ

Santos, Bruna Parapinski dos

Influência do vírus da artrite encefalite caprina no imunograma sanguíneo e
lácteo de cabras naturalmente infectadas / Bruna Parapinski dos Santos. -- 2012.
104 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

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

1. Leite. 2. Artrite encefalite caprina. 3. Caprinos. 4. Imunidade. 5. Citometria de
fluxo. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Imunograma da glândula mamária de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite encefálica caprina", utilizando 100 (cem) caprinos, protocolado sob o nº1684/2009, sob a responsabilidade da Profa Dra Alice Maria Melville Paiva Della Libera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 01/07/09.

We certify that the Research "Mammary gland immunogram of goats naturally infected with caprine encephalitis arthritis", utilizing 100 (one hundred) goats, protocol number 1684/2009, under the responsibility Profa Dra Alice Maria Melville Paiva Della Libera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 07/01/09.

São Paulo, 13 de julho de 2009

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Bruna Parapinski

Título: **Influência do vírus da artrite encefalite caprina no imunograma sanguíneo e lácteo de cabras naturalmente infectadas**

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

Data __/__/__

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Julgamento _____

DEDICATÓRIA

A *Deus*,

por me amar tanto e ter enviado seu filho Jesus Cristo que morreu e ressuscitou pra me salvar e me livrar dos meus pecados. Companheiro e amigo para todas as horas, sem a fé e esperança que Ele me deu jamais teria conseguido ficar esse tempo longe da minha família que amo tanto!

A Ele sejam dadas toda honra e toda a glória para sempre.

A toda minha *família*,

em especial aos meus pais que me apoiaram todo o tempo, garantindo além do apoio emocional, ajuda financeira e tudo mais que precisei. Eles que sempre estiveram ao meu lado, muitas vezes me colocando como prioridade.

À minha querida *orientadora*,

Que me ensinou muito sobre a pós-graduação, veterinária e principalmente sobre a vida. Mais que uma professora, uma amiga... mais que uma amiga, uma mãe...

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me sustentado todo o tempo, e ter me permitido chegar até aqui.

Aos **meus pais**, Sônia e Ildefonso que me apoiaram sempre, me dando o suporte familiar, afetivo e financeiro para a realização desse sonho.

Ao **meu irmão**, Tico, que sempre esteve à disposição para tudo que precisei, desde meu comprador de passagem, meu taxi em Londrina e principalmente meu irmão e amigo. Obrigada!

À **minha irmã**, Carol, por todas as sabias dicas de quem já passou por esse caminho e sabe as muitas pedras que encontramos, seus conselhos sempre me ajudaram muito!

A toda **minha família**, em especial a minha tia Silvia, tio Beto, Betinho e Camila, que foram minha família mais próxima de São Paulo, mesmo sendo poucas vezes, quando eu precisei eu tive colo e pude contar com vocês. Obrigada!

A todos **os meus amigos** que estiveram presente neste momento da minha vida:

Fernanda Stievani, que se tornou uma grande amiga e com certeza foi um conforto, ombro e ouvido e uma grande companheira muito importante em tantos momentos dessa fase... Muito obrigada por todas as nossas conversas e os programinhas que eu tanto gostava!

Ana Carolina Aniz, que mesmo de longe sempre esteve participando e torcendo muito por essa vitória!

Maíra Bianchi (Doci-72), que teve a coragem de se aventurar comigo pra alugarmos nosso apartamento, onde aprendi a viver com pessoas tão diferentes e tivemos bons momentos e boas conversas, sempre com muito respeito e amizade. Muito Obrigada!

Mariana Queiroz (Xumbada-72), uma “maluquinha” com um grande coração e vontade enorme de viver, que me ensinou a não reclamar de nada e fazia me sentir a melhor cozinheira do mundo! Muito obrigada pela companhia todo esse tempo!

Às **outras moradoras da nossa república** Joyce, Juliana (Kit73), que mesmo por pouco tempo deixaram uma marquinha nesse período da minha vida...

Às **minhas amigas de Londrina** que estiveram torcendo por mim e sempre que possível participando de alguma forma, em especial a **Beatriz Farah** e **Beatriz Azem** que muitas vezes me emprestaram os ouvidos quando era isso que eu mais precisava. Muito obrigada!

Às minhas **companheiras de faculdade** que sempre acreditaram e torceram por mim! Amigas que longe sempre estarão guardadas no fundo do coração!

A toda ***família Della Libera***, sem a qual nada disso teria acontecido, Muito obrigada a todos:

Alice Maria Melville Paiva Della Libera, por seus ensinamentos, paciência, doçura e por ser sempre meu exemplo de pessoa, mãe, profissional... Muito obrigada por todas as nossas conversas, e por sempre, sempre apoiar a sua equipe! É um orgulho saber que participei dessa família... e vou levar pra toda a minha vida o seu exemplo! Muito obrigada por tudo e principalmente por ser quem você é!

Camila Freitas Batista, por sua dedicação e disposição pelo trabalho, quantas vezes acordamos cedo, colhemos o dia todo e ainda terminamos no citômetro. Desde o planejamento, projeto, execução e relatórios, sua ajuda foi fundamental nessa pesquisa, serei eternamente grata a você!

Maiara Garcia Blagitz, por ter planejado esse trabalho, e me carregado no colo durante a minha inserção na equipe. E depois ainda me recebeu em Palotina para me ajudar nas análises. Muito obrigada por tudo!

Fernando Nogueira Souza, por nossas incríveis discussões e por todos os seus ensinamentos... Apesar de ser mineirinho você é muito inteligente, e sua ajuda foi muito importante... Obrigada querido!

Milton Ricardo Azedo, por compartilhar suas experiências e seus ensinamentos. Muito obrigada!

Heloísa Godoi Bertagnon, por toda a ajuda durante o experimento e por nossas conversas aleatórias... Você é um exemplo pra mim Helô, muito obrigada!

Maria Gabriela Barbosa Lima, por toda a ajuda na execução do projeto. Foram muitas madrugadas e tardes de experimento. Muito obrigada Gabi!

Renata Caminha Gomes, a caçulinha da equipe que chegou em uma hora tão atribulada, mas que ajudou tanto a todas aqui. Muito obrigada Re!

Giancarlo Bonagura, que mesmo de longe sempre torceu e se fez presente quando a situação se fez necessária. Obrigada!

Debora Silveira Santos, que, apesar de ser mineirinha, me ajudou muito na execução desse trabalho. Sua alegria sempre nos puxou para frente!

Daniel Magalhães Lima, que ficou conosco mais de um ano ajudando em todos os projetos da equipe, nas feiras e projeto de extensão. Muito obrigada Matungo, sua ajuda foi indispensável!

Raphael Schneider Vianna e Gabriel Garone de Lucca, que apesar de não estarem diretamente ligados a este projeto sempre estiveram prontos a ajudar. Muito obrigada!

Aos *pós-graduandos do Departamento de Clínica Médica* pelas trocas de experiências tão fundamentais na execução desse trabalho.

A *todos os residentes da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes*, que não mediram esforços quando a ajuda foi necessária. Obrigada!

À veterinária *Lívia Sacabb*, por ter aberto muitas portas para a nossa equipe, sua participação foi fundamental. Muito obrigada!

À zootecnista *Carla Francesconi* por todos os ensinamentos divididos nesse período e por ter auxiliado nossa equipe no campo quando foi necessário. Muito obrigada!

Aos *proprietários* dos animais que tão gentilmente abriram as porteiras de suas propriedades, muitas vezes tendo a rotina dos animais modificadas para auxiliar nesse trabalho. Sem essa oportunidade a execução desse projeto jamais seria possível.

À *Cláudia Regina Stricagnolo*, que participou ativamente na realização desse projeto e conseguiu me “domar” no laboratório. Além de ter se tornado uma amiga e companheira de ELISAS. Muito obrigada!

Às *técnicas dos laboratórios* que sempre foram tão importantes na realização de todas as análises laboratoriais, em especial a *Cláudia, Samanta, Cleide, Maria Luiza, Maria Helena, Dinha, Marli e Clara*. Muito obrigada!

Às *funcionárias do Departamento de Clínica médica*, em especial a *Adelaide, Cida, Silvana e Carol* que sempre estiveram a disposição para ajudar a resolver os problemas.

Aos *professores do Departamento de Clínica Médica* da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em especial aos professores de ruminantes *Fernando José Benesi, Maria Cláudia Araripe Sucupira, Viviani Gomes, Fábio Pogliani e Lilian Gregory* que foram tão importantes nessa etapa da minha formação..

À *professora Dr^a Cristina Oliveira Massoco*, por atender nossas dúvidas com tanta alegria e disposição. Um exemplo de boa vontade sem troca de interesses...

Aos *funcionários da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes, Edson, Luizinho e Francisco* que sempre estiveram a disposição para todo tipo de ajuda.

Aos *funcionários da biblioteca “Virginie Buff D’Ápice”*, que com tanta competência sempre estiveram dispostos a ajudar.

Aos *professores e funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia* que de alguma forma estiveram envolvidos durante o processo.

A *todos os professores e funcionários da Universidade Estadual de Londrina*, berço e pedra angular na minha formação pessoal e profissional. Em especial aos professores *Júlio Augusto*

Naylor Lisbôa e João Paulo Elsen Saut que tiveram fundamental participação na decisão do rumo que escolhi, e sempre torceram por essa conquista! Muito obrigada!

A todos os graduandos que participaram de alguma forma desta etapa tão importante, tanto nos momentos de trabalho quanto nos momentos de lazer. Aos meus eternos estagiários.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão do auxílio pesquisa que possibilitou a execução desse projeto (Processo FAPESP 2010/07716-3).

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão de bolsa (Processo FAPESP 2009/13410-7).

Aos ***animais*** que contribuíram involuntariamente para essa pesquisa, sem os quais todo esforço seria em vão.

Agradeço a todos que contribuíram de uma forma ou outra para a realização desse estudo.

Pois, que aproveitaria ao homem ganhar o mundo inteiro e perder a sua alma?

Marcos 8:36

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.
E ainda que tivesse o dom de profecia, **e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência**, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, **e não tivesse amor, nada seria.**

1 Coríntios 13:1-2

RESUMO

SANTOS, B. P. **Influência do vírus da artrite encefalite caprina no imunograma sanguíneo e lácteo de cabras naturalmente infectadas** [Influence of arthritis encephalitis caprine virus in blood and milk immunogram of naturally infected goats]. 2012. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A Artrite Encefalite Caprina (AEC) é uma lentivirose multisistêmica que tem a glândula mamária caprina como um dos alvos lesionais da doença. Pode causar uma manifestação mamária específica, chamada de mastite endurativa, além da mama representar uma importante via de eliminação do vírus, mesmo em animais que não apresentam a forma clínica. Considerando-se a possibilidade desta virose, cuja célula alvo predominante é o monócito, levar a alterações imunológicas que influenciem a susceptibilidade do animal a outras doenças, objetivou-se avaliar essa interação do vírus e da imunidade do hospedeiro por meio de fenotipagem, fagocitose e produção de Espécies reativas de oxigênio (ERO) e dos mecanismos de morte das células sanguíneas e lácteas de cabras naturalmente infectadas. Para isso 200 cabras foram triadas e, destas selecionadas oito fêmeas não sororreagentes e dez sororreagentes na pesquisa de anticorpos séricos para AEC, dentro dos padrões hematológicos da espécie e com dois exames bacteriológicos do leite negativos. O leite e o sangue colhido destes animais foram submetidos às seguintes provas: fenotipagem dos leucócitos CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, PG68A⁺ e CD45⁺, fagocitose de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli* por células CD14⁺ e PG68A⁺, produção de ERO e marcação com Anexina-V e Iodeto de Propídeo (PI) por granulócitos e células mononucleares. A infecção pelo VAEC pode ser associada a um aumento de células CD14⁺ no leite, mas não no sangue. Os outros perfis celulares não sofreram alterações. Quanto a função fagocítica, o vírus reduziu a porcentagem de fagocitose de *Staphylococcus aureus* por granulócitos PG68A⁺ do leite. Esta alteração não ocorreu na fagocitose de *Escherichia coli* e na produção de ERO dessas células, nem na fagocitose e produção de ERO pelas células CD14⁺ ressaltando que nesses processos a espécie bacteriana pode sofrer interações com o vírus ou mesmo com a resposta imune do organismo infectado. O VAEC não influenciou significativamente os mecanismos de morte ora investigados, mas a tendência dos resultados sugere que possa haver indução de morte por apoptose e/ou por necrose nos granulócitos do sangue e influenciar no processo de necrose destas células no leite, sem alterar esses processos nas células mononucleares. Ressalta-se a importância da interação monócito-neutrófilo na glândula mamária, principalmente nos animais sororreagentes para AEC, mesmo na ausência de mastite bacteriana.

Palavras-chave: Leite. Artrite Encefalite Caprina. Caprinos. Imunidade. Citometria de fluxo.

ABSTRACT

SANTOS, B. P. **Influence of caprine arthritis encephalitis virus on blood and milk immunogram of naturally infected goats** [Influência do vírus da artrite encefalite caprina no imunograma sanguíneo e lácteo de cabras naturalmente infectadas]. 2012. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The caprine arthritis encephalitis (CAE) is a multisystem lentivirose that have the goat mammary gland as one target of the lesional disease. May cause a mammary specific expression, called indurative mastitis, beyond these organ represent a major route of virus elimination, even in animals that do not exhibit this clinical manifestation. Considering the possibility of this virus, whose target cell are predominantly monocyte, lead to immunological changes that influence the animal's susceptibility to other diseases, this study aimed to evaluate the interaction of virus and host immunity by phenotyping, phagocytosis and production of reactive oxygen species (ROS) and the mechanisms of cell death, in blood and milk of goats naturally infected. For that, 200 goats were screened and was selected eight females non sero-reagents and ten seroreagents for serum antibodies against CAE, with the haematological analyses within the species standards and two negative bacteriological tests of milk. Milk and blood from these animals underwent the following tests: phenotyping of leukocytes CD4+, CD8+, CD14+, PG68A+ and CD45+, phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* ROS production by CD14+ and PG68A+ cells, and labeling with Annexin-V and propidium iodide (PI) for granulocytes and mononuclear cells. CAEV infection may be associated with an increase in CD14+ cells in milk, but not in blood. The other cellular profile did not change. In the phagocytic function, the virus reduced the percentage of phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by granulocytes PG68A+ milk. This change did not occur in the phagocytosis of *Escherichia coli* and production of ROS in these cells, nor in phagocytosis and ROS production by CD14+ cells, noting that in those cases the bacterial species may undergo interactions with the virus or even with the immune response of the infected organism. The VAEC not significantly affect the mechanism of death now investigated, but the tendency of the results suggests that can induce apoptosis and/or necrosis in the blood granulocytes and influence the process of necrosis of these cells in milk, without changing these processes mononuclear cells. We emphasize the importance of monocyte-neutrophil interaction in the mammary gland, especially in animals seropositive for CAE, even in the absence of bacterial mastitis.

Keywords: Milk. Caprine Arthritis Encephalitis. Goats. Immunity. Flow cytometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Identificação da população de granulócitos no sangue de caprino da raça Saanen utilizando granulossidade (SSC) <i>versus</i> tamanho (FSC) - São Paulo – 2011	39
Figura 2 – Identificação da população de mononucleares no sangue de caprino da raça Saanen utilizando granulossidade (SSC) <i>versus</i> tamanho (FSC) - São Paulo – 2011	40
Figura 3 - Identificação dos mononucleares CD4 ⁺ em FL3, <i>versus</i> CD8 ⁺ em FL3 no sangue de caprino da raça Saanen - São Paulo – 2011	40
Figura 4 - Identificação dos mononucleares CD14 ⁺ no sangue de caprino da raça Saanen - São Paulo – 2011	41
Figura 5 - Identificação dos granulócitos PG68A ⁺ no sangue de caprino da raça Saanen - São Paulo – 2011	41
Figura 6 - Identificação da população de linfócitos no leite de caprino da raça Saanen utilizando granulossidade (SSC) <i>versus</i> tamanho (FSC) - São Paulo – 2011	42
Figura 7 - Identificação da população de granulócitos no leite de caprino da raça Saanen utilizando granulossidade (SSC) <i>versus</i> tamanho (FSC) - São Paulo – 2011	43
Figura 8 - Identificação das células CD4 ⁺ em FL2 <i>versus</i> CD8 ⁺ em FL3, no leite de caprino da raça Saanen - São Paulo – 2011	43
Figura 9 - Identificação dos granulócitos PG68A ⁺ no leite de caprino da raça Saanen - São Paulo – 2011	44
Figura 10 - Identificação das células CD14 ⁺ no leite de caprino da raça Saanen - São Paulo – 2011	44
Figura 11 - Estratégia utilizada para a identificação das células CD14 ⁺ / <i>S. aureus</i> ⁺ no sangue de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos mononucleares granulossidade (SSC) <i>versus</i> tamanho (FSC), (B) Identificação dos mononucleares CD14 ⁺ (C) Porcentagem de células CD14 ⁺ que fagocitaram <i>S. aureus</i> marcada com fluoresceína. São Paulo – 2011	64
Figura 12 - Estratégia utilizada para a identificação das células PG68A ⁺ /DCFH ⁺ no sangue de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos polimorfonucleares utilizando granulossidade (SSC) <i>versus</i>	

tamanho (FSC), (B) Identificação dos PG68A⁺ dos granulócitos (C) Porcentagem de células PG68A⁺ que produziram DCFH. São Paulo – 2011 64

Figura 13 - Estratégia utilizada para a identificação das células CD14⁺/E.coli⁺ no sangue de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos mononucleares utilizando granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC), (B) Identificação dos mononucleares CD14⁺ (C) Porcentagem de células CD14⁺ que fagocitaram *E. coli* marcada com fluoresceína - São Paulo – 2011 64

Figura 14 - Estratégia utilizada para a identificação das células CD14⁺/DCFH⁺ no leite de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Citograma granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC), (B) Identificação dos CD14⁺ do total de células (C) Porcentagem de células CD14⁺ que produziram DCFH. São Paulo – 2011 65

Figura 15 - Estratégia utilizada para a identificação das células PG68A⁺/S. aureus⁺ no leite de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos granulócitos utilizando granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC), (B) Identificação dos PG68A⁺ dos granulócitos (C) Porcentagem de células PG68A⁺ que fagocitaram *S. aureus*. São Paulo – 2011 65

Figura 16 - Estratégia utilizada para a identificação das células PG68A⁺/E. coli⁺ no leite de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos granulócitos utilizando granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC), (B) Identificação dos PG68A⁺ dos granulócitos (C) Porcentagem de células PG68A⁺ que fagocitaram *E. coli*. São Paulo – 2011..... 66

Figura 17 - Porcentagem de células PG68A⁺ que fagocitaram *S. aureus* marcada com fluoresceína no leite de caprinos da raça Saanen do grupo AEC+ (A) e do grupo AEC- (B) 69

Figura 18 – Estratégia utilizada para a identificação dos processos de morte das células mononucleares e granulócitos no sangue de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos granulócitos e mononucleares utilizando granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC). (B) Porcentagem de granulócitos positivos para Anexina (FL1) e PI (FL3). (C) Porcentagem células mononucleares positivos para Anexina (FL1) e PI (FL3) - São Paulo – 2011 82

Figura 19 - Estratégia utilizada para a identificação das células CD14⁺ /Anexina V⁺ no sangue de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos mononucleares utilizando granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC). (B) Porcentagem de mononucleares que expressaram CD14 (FL3). (C) Porcentagem células CD14⁺ positivos para Anexina (FL1) - São Paulo – 2011 82

Figura 20 - Estratégia utilizada para a identificação dos processos de morte das células mononucleares e granulócitos no leite de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos granulócitos e mononucleares utilizando granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC). (B) Porcentagem de granulócitos que apresentaram Anexina (FL1) e PI (FL3). (C) Porcentagem células mononucleares positivos para Anexina (FL1) e PI (FL3) - São Paulo - 201183

Figura 21 - Estratégia utilizada para a identificação das células CD14⁺ /Anexina V⁺ no leite de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo (A) Porcentagem de células que expressaram CD14 (FL3). (B) Porcentagem células CD14⁺ positivos para Anexina (FL1) - São Paulo – 201183

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Representação gráfica em box-plot do número de lactações das cabras Saanen subdivididas em dois grupos: não sororreagente ao vírus (AEC-) e sororreagente ao vírus (AEC+) – São Paulo - 201147
- Gráfico 2 - Representação gráfica em box-plot dos dias em lactações das cabras Saanen subdivididas em dois grupos: não sororreagente ao vírus (AEC-) e sororreagente ao vírus (AEC+) – São Paulo - 201147
- Gráfico 3 - Representação gráfica em box-plot da frequência de células CD14⁺ no leite das cabras subdivididas em dois grupos: não sororreagente ao vírus (AEC-) e sororreagente ao vírus (AEC+) – São Paulo – 201151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para marcação de leucócitos caprinos – São Paulo - 2011	37
Tabela 2 - Quantidades de anticorpos utilizadas em cada tubo de experimento no sangue e no leite de caprino – São Paulo - 2011	38
Tabela 3 - Composição dos grupos experimentais de caprinos Saanen de acordo com diagnóstico de Artrite encefalite caprina- São Paulo - 2011	46
Tabela 4 - Dias em lactação e número de lactações de caprinos Saanen em relação aos grupos experimentais – São Paulo - 2011	46
Tabela 5 – Resultados dos testes diretos de celularidade do leite de caprino em relação aos grupos experimentais - São Paulo – 2011	48
Tabela 6 - Resultado do CMT do leite obtido das metades mamária de caprinos Saanen relativos aos grupos experimentais.....	48
Tabela 7 - Média e desvio padrão da composição do leite de caprino em relação aos grupos experimentais – São Paulo - 2011	49
Tabela 8 – Valores percentuais das células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD14 ⁺ e PG68A ⁺ e a razão entre as porcentagens de células CD4 ⁺ /CD8 ⁺ no sangue de caprino Saanen em relação aos grupos experimentais– São Paulo 2011	50
Tabela 9 - Valores percentuais das células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD14 ⁺ , PG68A ⁺ , CD45 ⁺ e a razão entre as porcentagens de células CD4 ⁺ /CD8 ⁺ no leite de caprino Saanen em relação aos grupos experimentais – São Paulo 2011	50
Tabela 10 - Esquema dos tubos utilizados no experimento de fagocitose e produção de ERO de acordo com o objetivo e dos componentes acrescidos a cada tubo – São Paulo – 2011	63
Tabela 11 - Valores percentuais e intensidade de fluorescência da produção intracelular de ERO e fagocitose de <i>S. aureus</i> e de <i>E. coli</i> das células PG68A ⁺ do sangue de caprino Saanen em relação aos grupos experimentais - São Paulo 2011	67
Tabela 12 – Valores percentuais e intensidade de fluorescência da produção intracelular de ERO e fagocitose de <i>S. aureus</i> e de <i>E. coli</i> das células CD14 ⁺ do sangue de caprino Saanen em relação aos grupos experimentais- São Paulo 2011	68
Tabela 13 - Valores percentuais e intensidade de fluorescência da produção intracelular de ERO e fagocitose de <i>S. aureus</i> e de <i>E. coli</i> das células PG68A ⁺ do leite de caprino Saanen em relação aos grupos experimentais - São Paulo 2011	69

Tabela 14 - Valores percentuais e intensidade de fluorescência da produção intracelular de ERO e fagocitose de <i>S. aureus</i> e de <i>E. coli</i> das células CD14 ⁺ do leite de caprino - São Paulo 2011	70
Tabela 15- Discriminação dos tubos e respectivos conteúdos utilizados no experimento de morte celular – São Paulo - 2011	81
Tabela 16 – Porcentagens dos granulócitos que marcaram com Anexina-V e/ou PI de acordo com os grupos experimentais em sangue de caprino - São Paulo 2011	85
Tabela 17 – Porcentagens dos mononucleares que marcaram com Anexina-V e/ou PI de acordo com os grupos experimentais em sangue de caprino - São Paulo 2011	86
Tabela 18 Porcentagens das células CD14 ⁺ que expressaram anexina-V no sangue e no leite de caprinos de acordo com os grupos experimentais - São Paulo - 2011	86
Tabela 19 - Porcentagens (médias e desvios padrões) dos granulócitos que marcaram com Anexina-V e/ou PI de acordo com os grupos experimentais em leite de caprino - São Paulo 2011	87
Tabela 20 – Porcentagens (médias e desvios padrão) das células mononucleares que marcaram com Anexina-V e/ou PI de acordo com os grupos experimentais no leite de caprino - São Paulo 2011	88

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
3	OBJETIVOS GERAIS	27
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27

Capítulo 1. Imunofenotipagem das células do sangue e leite de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite encefalite caprina	28
---	----

5	APRESENTAÇÃO	29
6	MATERIAL E MÉTODOS	32
6.1	ANIMAIS UTILIZADOS	32
6.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	32
6.3	DIAGNÓSTICO DA AEC	33
6.4	EXAME CLÍNICO DA GLÂNDULA MAMÁRIA	33
6.5	HEMOGRAMA	34
6.6	AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE E COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	34
6.7	AVALIAÇÃO IMUNITÁRIA.....	35
6.7.1	Recuperação de células para os ensaios imunitários	36
6.7.2	Contagem e viabilidade celular	36
6.7.3	Imunofenotipagem dos leucócitos sanguíneos e lácteos	37
6.8	ANÁLISE DA CITOMETRIA DE FLUXO	38
6.8.1	Análise do sangue	39
6.8.2	Análise do leite	42
6.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
7	RESULTADOS	46
7.1	AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE	47
7.2	COMPOSIÇÃO LÁCTEA.....	48
7.3	IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E LÁCTEAS	49
8	DISCUSSÃO.....	52

Capítulo 2. Fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio pelas células do sangue e leite de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite encefalite caprina	58
---	----

9	APRESENTAÇÃO	59
10	MATERIAL E MÉTODOS	61
10.1	ANIMAIS UTILIZADOS	61
10.2	AVALIAÇÃO IMUNITÁRIA.....	61
10.2.1	Produção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i> e de <i>Escherichia coli</i>	61
10.2.2	Análise do sangue	63
10.2.3	Análise do leite	65
10.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
11	RESULTADOS	67
11.1	AVALIAÇÃO IMUNITÁRIA.....	67

11.1.1	Produção intracelular de Espécie Reativa de Oxigênio (ERO) e fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i> e de <i>Escherichia coli</i>	67
12	DISCUSSÃO	71
Capítulo 3. Avaliação da apoptose e necrose das células mononucleares e dos granulócitos do sangue e do leite de animais naturalmente infectados pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina.....		
		75
13	APRESENTAÇÃO	76
14	MATERIAL E MÉTODOS	79
14.1	ANIMAIS UTILIZADOS.....	79
14.2	AVALIAÇÃO IMUNITÁRIA.....	79
14.3	MORTE CELULAR	79
14.1	ANÁLISE DA CITÔMETRIA DE FLUXO	81
14.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	84
15	RESULTADOS	85
15.1	MORTE CELULAR	85
16	DISCUSSÃO	89
17	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que há 10.000 anos, a cabra tenha sido o primeiro animal a ser domesticado pelo homem. A partir de então, difundiu-se por diferentes regiões, incluindo ambientes inviáveis para outras espécies de produção (HAEINLEIN, 2007). Sua capacidade de produzir alimento de alta qualidade em diversas condições climáticas tornou o leite caprino o mais consumido pela espécie humana (SILANIKOVE, 2000; SILANIKOVE et al., 2010). Este rico alimento atende a duas realidades completamente opostas, por um lado fornece nutrientes a famílias de baixa renda em regiões mais inóspitas, e, por outro, se adequa constantemente à produção de artigos de *delicatessem* e um consumidor extremamente exigente com maior valor agregado aos produtos de origem caprina.

Neste cenário, intensifica-se a produção leiteira em busca de melhores resultados. A exemplo do que também ocorre em outras espécies de produção, o implemento da tecnificação aumenta a frequência de enfermidades no rebanho, como as helmintoses, a linfadenite, a mastite, a pneumonia e a artrite (PINHEIRO et al., 2000).

Por princípio, toda afecção limita a produtividade animal, mas as enfermidades mamárias, com toda sua diversidade nosológica, representam um risco constante, principalmente para os animais mais especializados para produção de leite. A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária responsável por grande prejuízo nos sistemas de produção, caracterizado pela diminuição nos padrões quantitativos e qualitativos do leite (SOUZA et al., 2012). Possui uma diversidade de agentes causadores, sendo os microorganismos do gênero *Staphylococcus* os mais frequentes. Também são comumente isolados *Streptococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, *Corynebacterium* spp. e alguns fungos (CONTRERAS et al., 2007).

Uma afecção mamária específica dos caprinos ocorre em aproximadamente 6 % dos animais sororreagentes ao vírus da artrite encefalite caprina (VAEC). Nestes, manifesta-se uma mastite dita endurativa (LARA et al., 2005). Apesar da artrite encefalite caprina (AEC) estar muito difundida nos plantéis caprinos brasileiros (SANTIN et al., 2002; LEITE et al., 2004; BANDEIRA et al., 2009; MOURA SOBRINHO et al., 2010), a influência exata do VAEC na glândula mamária ainda não está completamente elucidada.

Soma-se ao fato, a glândula mamária prestar-se a importante fonte de eliminação do vírus mesmo em animais aparentemente sem alteração clínica (EAST et al., 1993).

Na patogenia da AEC, monócitos, macrófagos e células dendríticas são as células alvo da infecção. Os monócitos infectados migram para os órgãos alvo, incluindo o úbere, onde se diferenciam em macrófagos (NARAYAN et al., 1982).

Estes macrófagos são capazes de produzir citocinas que podem induzir a uma inflamação crônica imunomediada (ZINK; YAGER; MYERS, 1990; LECHAT et al., 1997). Dentre essas, foi relatado aumento de MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1* – Proteína 1 quimioatraente de monócito), uma quimiocina capaz de atrair monócitos e linfócitos T para o tecido alvo (CARR et al., 1994).

Estas observações implicam na hipótese da infecção pelo VAEC causar alterações imunitárias mamárias que podem alterar a suscetibilidade do animal a outras enfermidades.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A artrite encefalite caprina (AEC) é uma enfermidade causada por um lentivírus da família Retrovirinae, subfamília Orthoretrovirinae, gênero lentivírus (ICTV, 2009). Esta doença está difundida em muitos países, inclusive no Brasil (PETERHANS et al., 2004).

A prevalência nos estados brasileiros é muito variada (SANTIN et al., 2002; BANDEIRA et al., 2009; MOURA SOBRINHO et al., 2010), sendo que no estado de São Paulo está disseminada em mais de 40 % dos caprinos (LEITE et al., 2004).

Apesar da denominação da doença aludir às manifestações articulares e neurológicas, também são associadas ao complexo nosológico desta virose, manifestações de pneumonia intersticial crônica, mastite intersticial endurativa e perda de peso progressiva em animais adultos (BANKS et al., 1983; NARAYAN et al., 1985; LARA et al., 2005; AL-QUDAH et al., 2006).

Esta enfermidade foi inicialmente descrita no século passado, sendo caracterizada pela primeira vez em 1959 na Suíça, onde observou-se artrite crônica em animais adultos (STÜNZI et al., 1964). Apesar disso, o vírus só foi reconhecido como causador da doença em 1980 quando recebeu a classificação e denominação atual – Vírus da Artrite Encefalite Caprina (VAEC) (CRAWFORD et al., 1980; NARAYAN et al., 1980).

Em ovinos é descrita uma lentivirose muito semelhante, o Maedi-Visna (MV). Esta denominação origina-se do islandês e significa “desorientação” (maedi) e “dispnéia” (visna), referenciando as principais manifestações clínicas da enfermidade: a pneumonia intersticial crônica, e a leucoencefalomielite (DAWSON, 1980). Inicialmente foram descritas como duas doenças distintas, atribuídas a dois vírus (SIGURSDSSON; THORMAR; PÁLSSON, 1960; SIGURDARDÓTTIR; THOMAR, 1964), mas as semelhanças entre elas foram observadas, e a doença foi caracterizada como uma só: Maedi-Visna (THORMAR, 1965; THORMAR; HELGADOTTIR, 1965).

Originalmente se considerava que o vírus da maedi-visna só infectasse ovinos e o VAEC caprinos. Entretanto, estudos epidemiológicos moleculares têm mostrado que estas duas viroses têm variantes que infectam as duas espécies, ou ainda, variantes formadas da combinação dos dois vírus. Assim, essas enfermidades passaram a ser referidas como lentivirose dos pequenos ruminantes (LVPR) (KARR et al., 1996; LEROUX et al., 1997).

As lentiviroses se caracterizam por serem doenças multissistêmicas e com habilidade de permanecer em latência (NARAYAN; CLEMENTS, 1989). Esta latência se refere à ausência de expressão gênica de um patógeno na célula hospedeira, o que assegura a sobrevivência por longo período, e manifesta a cronicidade e perenidade da doença (COLEMAN; WU, 2009).

Para que isto ocorra, tem-se a formação do pró-vírus intracelular, onde um fragmento do DNA viral se integra ao DNA da célula hospedeira, de forma que as células do sistema imune são incapazes de detectá-lo. O hospedeiro não elimina a infecção, mas limita a replicação viral (CLEMENTS; ZINK, 1996).

Nas LVPR as principais células alvo do vírus são da série monócito-macrófagos e células dendríticas. As células precursoras desta linhagem são infectadas no sítio de produção, na medula óssea e os monócitos infectados são liberados no sangue, porém o vírus se mantém em latência até que estas células madurem e a replicação viral se inicie (NARAYAN et al., 1983; GENDELMAN et al., 1985, 1986).

Outra característica que favorece a persistência da infecção é a variabilidade genética que ocorre, permitindo ao vírus dissuadir o sistema imunológico de hospedeiro imunocompetente por meio da formação de variantes genéticas aparentemente não induzidas pela pressão de anticorpos neutralizantes (CLEMENTS et al., 1988; McGUIRE et al., 1988; CHEEVERS; KNOWLES; NORTON, 1991; CHEEVERS et al., 1993).

Atualmente se desconhece a cura para essa lentivirose. Esta limitação restringe o controle da afecção ao domínio das potenciais vias de transmissão e acirram a importância da glândula mamária caprina na cadeia epidemiológica. O colostro e o leite são importantes vias de transmissão da cabra para o cabrito. Programas de controle que separaram os recém-nascidos e substituem o fornecimento de colostro caprino por colostro e leite de vaca tem tido bons resultados, apesar de não conseguirem erradicar a doença do rebanho (EAST et al., 1993; TURIN et al., 2005).

Além da glândula mamária e suas respectivas secreções, outras vias de transmissão devem ser consideradas, como a via respiratória, por meio de aerossóis que podem ser responsáveis pela contaminação de animais de qualquer idade e criados a alguns metros de distância, principalmente em confinamentos. Outros fluídos corporais também podem disseminar a virose, porém assumem menor relevância. Os equipamentos utilizados para ordenhar também podem representar um fator de risco e a sequência na linha de

ordenha de acordo com o *status* sanitário do animal deve ser sempre considerada (EAST et al., 1993; BLACKLAWS et al., 2004; REINA et al., 2009).

Como apenas 30 % dos animais manifestam a enfermidade de forma clínica, os exames complementares assumem fundamental importância nos programas de controle e erradicação (PETERHANS et al., 2004).

O diagnóstico direto é a confirmação do vírus, pelo isolamento e caracterização ou pelo reconhecimento do ácido nucléico viral. O isolamento e a caracterização do vírus não são muito utilizados como diagnóstico de rotina, pois esta técnica é demorada e dispendiosa. O diagnóstico por meio do reconhecimento do ácido nucléico tem sido utilizado em técnicas como PCR (Reação em cadeia da polimerase), *Southern blotting*, hibridização *in situ*, e mais atualmente, o PCR em tempo real para quantificar a carga viral no animal (HASEGAWA, 2010; OIE, 2011).

As técnicas mais utilizadas são de diagnóstico sorológico e baseiam-se em imunodifusão em gel de ágar (IDGA), ELISA, *Western blot* e radioimunoprecipitação. Os dois últimos são de execução mais complexa, necessitam de laboratórios especializados e possuem maior acurácia e por isso são considerados os testes padrão ouro (*golden standard*) para determinação da sensibilidade e especificidade dos dois primeiros (OIE, 2011).

O diagnóstico físico também é importante bem como as avaliações após a morte. Em animais infectados, a replicação viral nos órgãos alvos resulta no desenvolvimento de uma resposta inflamatória intensa, com infiltrado de macrófagos e linfócitos. No pulmão, esta resposta caracteriza uma pneumonia em que predomina um denso infiltrado de linfócitos e macrófagos no tecido intersticial, perivascular e peribronquial (GEORGSSON; PÁLSSON, 1971; CLEMENTS; ZINK, 1996).

Nas articulações afetadas ocorre uma hiperplasia das membranas sinoviais com grande acúmulo de linfócitos, células plasmáticas e macrófagos. Nos casos mais avançados pode ocorrer bursite, mineralização dos tecidos moles da articulação e erosão da cartilagem (CRAWFORD et al., 1980; WILKERSON et al., 1995; CLEMENTS; ZINK, 1996).

Na glândula mamária se desenvolve uma mastite endurativa com intenso infiltrado de linfócitos periductais e intersticiais (LUJAN et al., 1991). Devido a infecção, estudos demonstram diminuição da produção leiteira na primeira lactação (LEITNER et al., 2010) ou ainda alterações na composição do leite (KABA et al., 2012).

Estudos *in vitro* estabeleceram modelos de desafio a diferentes células mamárias obtidas por biópsia e demonstraram a infecção em células endoteliais, células epiteliais luminais maduras e imaturas, fibroblastos e células mioepiteliais. Essas últimas, apesar da não interferência imune direta, aparentemente prestam-se ao importante papel de reservatório do VAEC entre as lactações, conferindo contínua apresentação do antígeno. Isto posto, a cada restabelecimento da lactação, o tecido circunvizinho é novamente exposto ao patógeno, o padrão lesional típico é restabelecido, e a via de eliminação do vírus, é restituída (MILHAU et al., 2005).

Além disso, as células epiteliais luminais maduras possuem a capacidade de estimular – *in vitro* – a migração e a adesão de leucócitos, assim como as células endoteliais. Se este mesmo fenômeno ocorrer *in vivo*, estas células infectadas podem ser responsáveis por modular as interações celulares e gerar alterações mais localizadas (LECHAT et al, 2005; MILHAU et al., 2005).

Os mecanismos que determinam a susceptibilidade a uma ou outra manifestação, ainda não estão claros, entretanto esses aspectos circunstanciam a hipótese do vírus promover sinalizações celulares e mecanismos imunes que alterem a susceptibilidade do animal infectado a outras doenças.

3 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar quantitativa e qualitativamente os leucócitos sanguíneos e lácteos de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Imunofenotipar as células $CD4^+$, $CD8^+$, $CD14^+$, $PG68A^+$ e $CD45^+$ do sangue e do leite de cabras naturalmente infectadas pelo VAEC.
- Avaliar a fagocitose de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e a produção intracelular de ERO por fagócitos sanguíneos e lácteos de cabras naturalmente infectadas pelo VAEC.
- Avaliar os mecanismos de morte das células polimorfonucleares e mononucleares no sangue e leite de cabras naturalmente infectadas pelo VAEC.

Capítulo 1. Imunofenotipagem das células do sangue e leite de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite encefalite caprina

5 APRESENTAÇÃO

Alguns vírus da família dos lentivírus são responsáveis por variações quantitativas nas principais populações de leucócitos no sangue (HAASE, 1986; GEORGE; PEDERSEN; HIGGINS; 1993). Em relação à AEC existem contradições sobre esse fenômeno (GREZEL et al., 1997; JOLLY et al., 1997; PONTI et al., 2008; KABA et al., 2011). Acredita-se que a presença do vírus no sangue e no leite acarrete em alterações nas proporções celulares, principalmente de fagócitos, responsáveis pela resposta inata da glândula mamária, que por sua vez podem sofrer modulações pelas células mononucleares.

Alguns autores acreditam que o VAEC não cause essas alterações fenotípicas sistêmicas, pois perceberam que em animais infectados, as porcentagens de células no sangue não diferem dos animais sadios (GREZEL et al., 1997). Outros autores, porém, referem maiores quantidades de linfócitos no grupo sororreagente (PONTI et al., 2008; KABA et al., 2011). Por sua vez, Jolly et al. (1997), referiram menor porcentagem das células $CD4^+$ e da relação $CD4^+/CD8^+$ em animais infectados pelo vírus, da mesma forma que ocorre na Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

A importância dos linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ nas modulações celulares e no desenvolvimento da SIDA é muito estudado. Sabe-se que este vírus infecta linfócitos T $CD4^+$ e que em determinadas fases da doença ocorre uma significativa depleção destas células e concomitantemente aumento dos linfócitos T $CD8^+$ (LEVY, 1993; MCMICHAEL, ROWLAND-JONES, 2001). A avaliação da eficácia do tratamento também é baseada na contagem destas células (PALELLA JR et al., 1998). Dessa forma a relação $CD4^+/CD8^+$ assume grande importância nesta enfermidade, bem como em doenças similares em diferentes espécies.

Outro exemplo seria o descrito em outra lentivirose imunossupressora: a imunodeficiência felina. Este vírus também infecta linfócitos T $CD4^+$ e, da mesma forma que ocorre na SIDA, na fase mais tardia da doença ocorre destruição destas células e aumento dos linfócitos $CD8^+$ (GEORGE; PEDERSEN; HIGGINS, 1993; PATEL et al., 2012).

Nas LVPR, sabe-se que o vírus não infecta linfócitos (GORRELL et al., 1992), mas essas células são bastante estudadas devido à sua importância como moduladores no

sistema imune, e por estar presente nos infiltrados celulares decorrentes da inflamação nos tecidos (CLEMENTS; ZINK, 1996).

Estes vírus infectam as células da série monócitos/macrófagos e células dendríticas (NARAYAN et al., 1982; RYAN et al., 2000). Esta linhagem celular é muito importante na patogenia da doença, uma vez que o vírus infecta a célula precursora na medula óssea, e esta se mantém como reservatório do vírus (GENDELMAN et al., 1985).

O monócito já é liberado no sangue infectado, mas nessa fase o vírus encontra-se na forma de pró-vírus, e não induz alterações sistêmicas. Quando atinge o órgão alvo e se diferencia em macrófago é que o vírus inicia a sua replicação e o organismo reconhece-o iniciando a inflamação (NARAYAN et al., 1982; GENDELMAN et al., 1986). Esta característica de passar despercebido pelo sistema imune até atingir um dos órgãos alvo, incluindo a glândula mamária, caracteriza o fenômeno “cavalo de tróia” (PELUSO et al., 1985).

Os macrófagos são células de extrema importância na regulação imune, pois atuam como células apresentadoras de antígenos e secretam citocinas e mediadores lipídicos com potentes atividades biológicas. Já foi demonstrado *in vitro* que o vírus pode desregular a expressão de algumas destas moléculas, aumentando a expressão de MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) e IL-8 (interleucina 8) e reduzindo a expressão de TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) (LECHNER et al., 1997).

É interessante ressaltar também que o vírus pode infectar outras células, como as células epiteliais mamárias, que estão diretamente envolvidas na produção láctea e estão envolvidas na resposta imune local (MSELLI-LAKHAL et al., 1999). A presença do vírus nessa glândula é associada a alterações quantitativas e qualitativas no leite (TURIN et al., 2005; BIRGEL JUNIOR et al., 2007; KABA et al., 2012), mas estes resultados muitas vezes são contraditórios (NORD; ÅDNØY, 1997; GOMES et al., 2011; SANTOS et al., 2011).

As proporções destas células no sangue e no leite vem sendo estudada por citometria de fluxo em animais saudáveis (WINNICKA et al., 1999; GUINGUEN et al., 1996; BOULAABA et al., 2011) e infectados por diferentes patógenos (PONTI et al., 2008; LEITNER et al., 2010).

Utilizando essa tecnologia, o presente estudo buscou determinar a interferência do vírus nas relações imunes buscando as alterações imunofenotípicas causadas pelo VAEC nas células do sangue e do leite de cabras naturalmente infectadas.

6 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto desenvolvido foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo em 01 de julho de 2009, protocolado sob o nº 1684/2009.

6.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Foram incluídas no experimento 200 cabras da raça Saanen, em lactação, com mais de sete dias pós-parto de duas propriedades comerciais produtoras de leite do Estado de São Paulo. Estes animais foram submetidos aos critérios de inclusão e exclusão amostrais, para composição dos grupos.

6.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi dividido em duas fases, sendo a primeira destinada à seleção da população estudada (triagem) e composição dos grupos que atenderam aos critérios de inclusão amostral e a segunda fase, que correspondeu às análises imunitárias propriamente ditas.

Inicialmente foram colhidas amostras de sangue para a realização do sorodiagnóstico para a AEC e amostras de leite para a realização dos exames bacteriológicos do leite. Para exclusão de animais com mastite bacteriana foram realizados no mínimo dois exames bacteriológicos do leite, com intervalo semanal.

Atendidos esses critérios foram constituídos os grupos:

- a) Animais negativos no sorodiagnóstico da artrite encefalite caprina (AEC-)
- b) Animais sororreagentes (AEC+)

Atendidos os critérios de inclusão amostral, iniciou-se a segunda fase do experimento. A cada dia de coleta foi selecionado um animal de cada grupo experimental de mesma idade, fase de lactação e número de lactações. Foram colhidas amostras de sangue e de leite e os critérios de inclusão e exclusão amostral (sorodiagnóstico, hemograma, exame clínico da glândula mamária) foram novamente testados para a confirmação da classificação das mamas no momento da colheita.

6.3 DIAGNÓSTICO DA AEC

Para a detecção dos anticorpos séricos específicos anti-AEC, foi utilizado o antígeno p28 por kits comerciais de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA)¹ e ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)². Para a confirmação do diagnóstico final, foram considerados negativos para a AEC, os animais não sororreagentes no teste de IDGA (maior especificidade) e no ELISA (maior sensibilidade).

6.4 EXAME CLÍNICO DA GLÂNDULA MAMÁRIA

Inicialmente, os animais foram encaminhados para a linha de ordenha. Após serem identificados, tiveram os úberes higienizados pelo ordenhador, e em seguida, a glândula mamária foi examinada (BIRGEL, 2004). Após o exame físico das mamas procedeu-se a prova de fundo escuro e a colheita da amostra destinada ao exame bacteriológico (NMC, 2004).

As amostras de leite colhidas para o exame bacteriológico foram semeadas em placas de Petri contendo meio de ágar-sangue de carneiro (5 %) e incubadas (37 °C por 24

¹ Biovetech®, Pernambuco, Brasil

²VRMD, Pullman, EUA. nº cat. 289-5

e 48 horas) (BAUER, 1966). Quando as amostras apresentaram crescimento bacteriano, as fêmeas foram excluídas do estudo.

6.5 HEMOGRAMA

O número total de leucócitos e de eritrócitos foi mensurado por meio da contagem automática no aparelho BC-2800VET, MINDRAY[®] após calibração específica para a espécie.

A contagem diferencial microscópica foi feita por esfregaços sanguíneos corados pela técnica de Rosenfeld (1947). A diferenciação do padrão leucocitário ao microscópio óptico foi feita com objetiva de imersão e aumento de 1000x, sendo identificados e contados 100 leucócitos (BIRGEL, 1982).

6.6 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Foram colhidos aproximadamente 50 mL de leite de cada teto, que foram mantidos refrigerados até a chegada ao laboratório, onde foram avaliados quanto à celularidade. Esta avaliação foi realizada por uma técnica indireta e duas diretas.

A primeira técnica indireta realizada foi o CMT (SCHALM e NOORLANDER, 1957), utilizando reagente³ (dois mL do reagente em dois mL de leite) observando-se a intensidade da reação (aumento da viscosidade da mistura leite – reagente).

Para a segunda técnica, desta vez direta, foi empregado o protocolo padrão em laboratório integrante da Rede Brasileira de Laboratórios de Análise da Qualidade do Leite (RBQL) e credenciado junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). As amostras foram transferidas para frascos contendo como conservante o

³ FATEC[®] S.A. – São Paulo, Brasil

bronopol e encaminhadas para a Clínica do Leite – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ – USP) (Piracicaba, SP) onde a CCS foi realizada por citometria de fluxo.

A outra técnica direta foi a contagem celular por microscopia direta. Utilizou-se 10µL de leite distribuídos em uma área de um cm² em uma lâmina de microscopia previamente limpa e desengordurada. A seguir as lâminas foram secas em temperatura ambiente (PRESCOTT; BREED 1910). Posteriormente as lâminas foram coradas com coloração de Rosenfeld, utilizando uma mistura de uma parte de corante em duas partes de água destilada. Em cada lâmina adicionou-se dois mL da mistura, permanecendo por oito minutos. Após esse período as mesmas foram lavadas com água destilada e permaneceram na vertical até secar. Foram contados 100 campos, utilizando-se microscópio ótico comum com objetiva de imersão. Para o resultado final este valor foi multiplicado pelo fator de correção do microscópio.

Para a avaliação da composição do leite foi utilizada a mesma amostra enviada para a Clínica do leite – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (ESALQ – USP) (Piracicaba, SP), e a análise foi realizada pela técnica de infravermelho.

6.7 AVALIAÇÃO IMUNITÁRIA

Foi colhido aproximadamente 300 mL de leite de cada teto, crescido de 300 mL de *Phosphate buffer saline* (PBS) em frascos de 1000 mL, destinada às provas imunológicas.

Em seguida, foram colhidas amostras de sangue de cada animal por venopunção da veia jugular, utilizando-se sistema à vácuo em tubos com heparina e EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*). O sangue colhido em tubos com heparina foi destinado à quantificação das subpopulações de leucócitos. O sangue colhido em tubos contendo EDTA foi utilizado para a realização do hemograma.

Todas as amostras foram mantidas em refrigeração até a chegada ao laboratório.

6.7.1 Recuperação de células para os ensaios imunitários

O leite colhido em PBS refrigerado foi centrifugado a $1000 \times g$ por 15 minutos a 4°C em tubos de 50 mL de prolipropileno com fundo cônico⁴. O sobrenadante mais viscoso formado no espelho da amostra, constituído principalmente de gordura, foi retirado antes de reverter o frasco.

Após desprezar o sobrenadante invertendo-se o frasco uma única vez, ficou preservado apenas o botão de células no fundo do frasco. Esse botão foi ressuspensionado através da aspersão gentil de PBS (aproximadamente 10 mL de PBS por frasco), todos os frascos de 50 mL centrifugados, correspondentes a uma amostra inicial de 600 mL foram acondicionados em quatro em frascos limpos. Foram realizadas três centrifugações, sendo a primeira como descrita acima e as posteriores a $400 \times g$ por 10 minutos (4°C), e finalmente se obteve o botão celular em apenas um frasco de 50 mL.

Após uma terceira centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o botão formado desprendido e ressuspensionado em aproximadamente 3 mL de meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*)⁵ enriquecido com soro fetal bovino 10 % para preservar as condições celulares (KOESS; HAMANN, 2008).

6.7.2 Contagem e viabilidade celular

A contagem celular foi realizada na câmara de Neubauer e a viabilidade celular avaliada por meio da exclusão do azul de Trypan. Foi utilizado 90 μL do azul de Trypan a 0,4 % e 10 μL de suspensão celular. Desta mistura, retirou-se 10 μL para a contagem na câmara de Neubauer. Divide-se este valor pelo fator de diluição (40) e o valor encontrado é expresso em 10^6 por mL. Em seguida, a suspensão celular foi ajustada em 2×10^6 células viáveis/mL para a realização das provas imunológicas.

⁴ Tubos Falcon (50mL) – Becton e Dickson, Plymouth, Devon, Reino Unido

⁵ (RPMI 1640) – Sigma R7638

6.7.3 Imunofenotipagem dos leucócitos sanguíneos e lácteos

A aquisição dos dados foi feita por citometria de fluxo⁶ quanto à porcentagem de cada tipo celular. Foram adquiridos aproximadamente 30000 eventos nas amostras sanguíneas e 15000 eventos nas amostras lácteas.

Foram identificados os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, e as células CD14⁺ e PG68A⁺ no sangue e no leite. No leite também foram identificados os leucócitos CD45⁺. A identificação foi feita com os anticorpos que estão apresentados na

Tabela 1. A marcação do secundário foi feita pelos anticorpos *goat anti-mouse* IgG_{2a} – PE⁷ e *goat anti-mouse* IgG1 RPE-Cy5⁸, *goat anti-mouse* IgG1 FITC.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados para marcação de leucócitos caprinos – São Paulo - 2011

Anticorpo	Isótipo	Especificidade	Clone	Fonte
<i>Mouse anti-goat</i> CD4	IgG _{2a}	T auxiliares	GC1A	VMRD, Pullman, EUA
<i>Mouse anti-goat</i> CD8α	IgG ₁	T citotóxico	CACT80C	VMRD, Pullman, EUA
<i>Mouse anti human</i> CD14: RPE-CY5	IgG ₁	Fagócitos	MCA 2804C	AbDserotec, Oxford, UK
<i>Swine anti- mouse</i> PG68A	IgG ₁	Polimorfonucleares	PG68A	VMRD, Pullman, EUA
<i>Goat anti-mouse</i> CD45	IgG ₁	Leucócitos	BAB20A	VMRD, Pullman, EUA

Todos os anticorpos utilizados no experimento foram titulados para otimizar os resultados obtidos. A titulação foi feita com os anticorpos primários e secundários no leite e sangue de uma cabra sadia. O título inicial foi o recomendado pela empresa fabricante e este, foi sendo diluído da seguinte forma: 1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16. Os dados foram adquiridos por citometria e analisados para a determinação do melhor título a ser utilizado. As quantidades de cada anticorpo utilizadas por experimento apresenta-se na tabela 2.

⁶ FACSCalibur™ - Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, EUA.

⁷ Invitrogen, Carlsbad, EUA, n° cat. M32404

⁸ Invitrogen, Carlsbad, EUA, n° cat. M32018

Tabela 2 - Quantidades de anticorpos utilizadas em cada tubo de experimento no sangue e no leite de caprino – São Paulo - 2011

Anticorpo	Sangue	Leite
<i>Mouse anti-goat CD4</i>	0,25µL	1µL
<i>Mouse anti-goat CD8a</i>	0,25µL	0,25µL
<i>Mouse anti human CD14: RPE-CY5</i>	1µL	1µL
<i>Swine anti- mouse PG68A</i>	0,25µL	0,25µL
<i>Goat anti-mouse CD45</i>	-	0,25µL
<i>Goat anti-mouse IgG2a – PE</i>	0,25µL	1µL
<i>Goat anti-mouse IgG1 RPE-Cy5</i>	0,25µL	1µL
<i>Goat anti-mouse IgG1 - FITC</i>	0,25µL	0,25µL

Inicialmente as células foram incubadas com o anticorpo primário por 30 minutos a 4 °C. Foi feita a lavagem com 1000 µL de PBS gelado e centrifugado a 250 x g por 8 minutos (4 °C). Após desprezar o sobrenadante foi feita a marcação com anticorpo secundário por 30 minutos a 4 °C protegidas da luminosidade. Novamente a lavagem foi feita com 1000 µL de PBS gelado e centrifugado a 250 x g por 8 minutos (4 °C). Após desprezar o sobrenadante as células foram ressuspensas em 300 µL de PBS acrescidos de 0,1% Albumina Sérica Bovina (BSA⁹). As amostras foram adquiridas por citometria de fluxo.

6.8 ANÁLISE DA CITOMETRIA DE FLUXO

Os dados obtidos nas leituras da Citometria de fluxo foram analisados no *software Flow Jo*¹⁰.

⁹ INLAB, São Paulo, Brasil, n° cat. 1870

¹⁰ *Treestar* – Versão 7.6.1 para Windows.

6.8.1 Análise do sangue

Nas amostras sanguíneas as células foram identificadas por seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Neste painel foram criados *gates* para definir as populações de granulócitos (figura 1) e de mononucleares (figura 2). Das células caracterizadas como mononucleares foram avaliadas as porcentagens de células que expressaram CD4 e CD8 (figura 3) e CD14 (figura 4). Em relação aos granulócitos foi avaliada a porcentagem de células que expressaram o anticorpo PG68A (figura 5).

Figura 1 - Identificação da população de granulócitos no sangue de caprino da raça Saanen utilizando granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC) - São Paulo – 2011

Figura 2 – Identificação da população de mononucleares no sangue de caprino da raça Saanen utilizando granulidade (SSC) versus tamanho (FSC) - São Paulo – 2011

Figura 3 - Identificação dos mononucleares $CD4^+$ em FL3, *versus* $CD8^+$ em FL3 no sangue de caprino da raça Saanen - São Paulo – 2011

Figura 4 - Identificação dos mononucleares CD14⁺ no sangue de caprino da raça Saanen - São Paulo – 2011

Figura 5 - Identificação dos granulócitos PG68A⁺ no sangue de caprino raça Saanen - São Paulo – 2011

6.8.2 Análise do leite

Nas amostras lácteas as células foram identificadas por seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Neste painel foram criados *gates* para definir as populações de linfócitos (figura 6) e de granulócitos (figura 7). Dos linfócitos foi feita a marcação das células $CD4^+$ e $CD8^+$ (figura 8) e dos granulócitos a marcação das células $PG68A^+$ (figura 9). Do total de células foi feita a marcação de $CD45^+$ e destas células foi feita a marcação de $CD14^+$ (figura 10).

Figura 6 - Identificação da população de linfócitos no leite de caprino raça Saanen utilizando granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC) - São Paulo – 2011

Figura 7 - Identificação da população de granulócitos no leite de caprino raça Saanen utilizando granulocidade (SSC) versus tamanho (FSC) - São Paulo – 2011

Figura 8 - Identificação das células $CD4^+$ em FL2 versus $CD8^+$ em FL3, no leite de caprino da raça Saanen - São Paulo – 2011

Figura 9 - Identificação dos granulócitos PG68A⁺ no leite de caprino raça Saanen - São Paulo – 2011

Figura 10 - Identificação das células CD14⁺ no leite de caprino raça Saanen - São Paulo – 2011

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad InStat®, versão 3.01 para Windows 9537.

Foi verificada a normalidade da distribuição dos resultados, utilizando-se teste de Anderson-Darling.

Para a avaliação das diferenças entre as médias dos resultados obtidos, foram realizados os testes de análise de variância ANOVA One-way (Unstacked) (para dados com distribuição normal) e Mann-Whitney (para dados que não apresentaram distribuição normal). Para todos os resultados, foram consideradas significantes as análises que apresentaram $P \leq 0,05$ e foram consideradas como tendência as amostras que apresentaram o P entre 0,05 e 0,10 (PANTOJA et al., 1996).

7 RESULTADOS

Foram colhidas amostras de 24 cabras, sendo 12 sororreagentes e 12 não sororreagentes aos testes de AEC. Destas, cinco apresentaram o hemograma fora dos valores de referência para a espécie (PUGH, 2005), sendo portanto excluídas das análises. Duas cabras tiveram uma metade mamária positiva no exame bacteriológico, sendo estas amostras excluídas das análises. Sendo assim a formação dos grupos ficou definida de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 - Composição dos grupos experimentais de caprinos Saanen de acordo com diagnóstico de Artrite encefalite caprina- São Paulo - 2011

	Número de animais	Número de metades mamárias
AEC-	8	16
AEC+	10	18

AEC: Artrite Encefalite Caprina

O número de lactações e os dias em lactação dos animais de acordo com os grupos estudados estão demonstrados na Tabela 4 e nos gráficos 1 e 2.

Tabela 4 - Dias em lactação e número de lactações de caprinos Saanen em relação aos grupos experimentais – São Paulo - 2011

		Dias em Lactação	Número de Lactações
AEC –	Média	142,78 ^a	2,62
	Desvio Padrão	(±73,98)	(± 1,45)
	Mediana	175	2,0 ^a
	Mín-Máx	(28-236)	(1-5)
AEC +	Média	151,57 ^a	2,8
	Desvio Padrão	(± 70,03)	(± 1,43)
	Mediana	160	2,5 ^a
	Mín-Máx	(29-247)	(1-5)
	P	0,77	0,66

AEC: Artrite Encefalite Caprina

Gráfico 1 - Representação gráfica em box-plot do número de lactações das cabras Saanen subdivididas em dois grupos: não sororreagente ao vírus (AEC-) e sororreagente ao vírus (AEC+) – São Paulo - 2011

Gráfico 2 - Representação gráfica em box-plot dos dias em lactações das cabras Saanen subdivididas em dois grupos: não sororreagente ao vírus (AEC-) e sororreagente ao vírus (AEC+) – São Paulo - 2011

7.1 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE

Os resultados dos testes de celularidade direta por grupo experimental não apresentaram diferença e estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados dos testes diretos de celularidade do leite de caprino em relação aos grupos experimentais - São Paulo – 2011

Grupo (n)		CCS microscópica		CCS automática	
		(x 1000/mL)	(Log 10)	(x 1000/mL)	(Log 10)
AEC – (16)	Média	1413,1	3,06	925,94 ^a	2,56 ^a
	Desvio Padrão	(± 858,43)	(± 0,30)	(± 1371,2)	(± 0,62)
	Mediana	1265,9 ^a	3,10 ^a	273,0	2,44
	Mín-Máx	(292,82-2956,8)	(2,47-3,47)	(48-5024)	(1,68-3,70)
AEC + (18)	Média	1049,7	2,95	1599,4 ^a	2,81 ^a
	Desvio Padrão	(± 788,89)	(± 0,22)	(± 2421,0)	(± 0,62)
	Mediana	840,97 ^a	2,92 ^a	562,5	2,75
	Mín-Máx	(499,94-3842,4)	(2,70-3,58)	(72,0-9999,0)	(1,86-4,0)
P		0,19	0,20	0,30	0,23

AEC: Artrite Encefalite Caprina

CCS: Contagem de Células Somáticas

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05)

Os números de animais por grupo experimental que reagiram ao CMT estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Resultado do CMT do leite obtido das metades mamária de caprinos Saanen relativos aos grupos experimentais.

Grupo (n)	Negativo	Traços	1+	2+	3+
AEC- (16)	8	3	4	3	0
AEC+ (18)	4	5	5	5	1
Total	12	8	9	8	1

AEC: Artrite Encefalite Caprina

CMT: *California Mastitis Test*

7.2 COMPOSIÇÃO LÁCTEA

Os resultados de composição do leite dos caprinos estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 - Média e desvio padrão da composição do leite de caprino em relação aos grupos experimentais – São Paulo - 2011

		Gordura (%m/m)	Proteína (%m/m)	Lactose (%m/m)	ST (%m/m)	ESD (%m/m)
AEC-	Média	2,181 ^a	2,752 ^b	4,190 ^a	9,965 ^a	7,775 ^b
	Desvio Padrão	(±0,4533)	(± 0,2078)	(±0,2301)	(±0,6170)	(± 0,2731)
	Mediana	2,11	2,69	4,28	9,96	7,83
	Mín-Máx	(1,46-3,0)	(2,38-3,10)	(3,72-4,52)	(8,92-10,86)	(7,27-8,36)
AEC+	Média	2,101 ^a	3,209 ^a	4,267 ^a	10,395 ^a	8,294 ^a
	Desvio Padrão	(± 0,7321)	(± 0,6607)	(± 0,3817)	(± 1,234)	(± 0,6167)
	Mediana	1,99	3,03	4,30	10,14	8,23
	Mín-Máx	(1,15-4,43)	(2,67-5,20)	(3,09-4,87)	(9,01-13,6)	(7,66-10,25)
P		0,69	0,0076	0,46	0,17	0,0021

AEC: Artrite Encefalite Caprina

ST: Teor de Sólidos Totais

ESD: Extrato seco desengordurado

Letras minúsculas diferentes entre linhas indicam diferenças entre os grupos (P<0,05)

As porcentagens de proteína e de teor de sólidos totais (ST) apresentaram diferença quando comparados os dois grupos. A média do valor de proteína foi mais alta no grupo AEC+ (P=0,0038) bem como o extrato seco desengordurado (ESD) (P=0,021). As porcentagens de gordura, lactose e sólidos totais (ST) não apresentaram diferença.

7.3 IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS SANGUÍNEAS E LÁCTEAS

As médias e desvios padrão das porcentagens de células CD4⁺ e CD8⁺, PG68A⁺, CD14⁺ e da razão CD4⁺/CD8⁺ do total de células do sangue não apresentaram diferença entre os grupos experimentais e estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Valores percentuais das células CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e PG68A⁺ e a razão entre as porcentagens de células CD4⁺/CD8⁺ no sangue de caprino Saanen em relação aos grupos experimentais– São Paulo 2011

		CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	PG68A ⁺ (%)	CD14 ⁺ (%)
AEC-	Média	12,94 ^a	12,29 ^a	1,08 ^a	44,41 ^a	5,44 ^a
	Desvio Padrão	(±5,05)	(±3,53)	(±0,38)	(± 11,12)	(± 3,38)
	Mediana	13,20	10,85	0,32	40,25	4,23
	Mín-Máx n	(6,76-23,20) 8	(8,04-18,90) 8	(0,02-0,63) 8	(27,90-62,00) 8	(3,72 – 13,70) 8
AEC+	Média	12,22 ^a	14,41 ^a	0,95 ^a	43,22 ^a	3,86 ^a
	Desvio Padrão	(±2,60)	(±5,97)	(±0,35)	(± 10,96)	(± 1,23)
	Mediana	12,80	12,0	0,26	44,30	4,15
	Mín-Máx n	(8,46-15,90) 9	(8,37-27,50) 9	(0,00-0,75) 9	(22,80-58,40) 10	(1,86 – 5,79) 10
P		0,72	0,40	0,48	0,82	0,19

AEC: Artrite Encefalite Caprina

PG68A⁺: Polimorfonucleares⁺

Mín - Máx: mínimo-máximo

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05)

As médias, desvios padrão, medianas e amplitude das porcentagens de células CD4⁺, CD8⁺, PG68A⁺, CD14⁺ e CD45⁺ do leite de caprino estão apresentados na tabela 9. Os valores de CD4⁺, CD8⁺, PG68A⁺ e CD45⁺ não apresentaram diferença entre os grupos experimentais. As médias das porcentagens de CD14⁺ apresentaram diferença entre os grupos experimentais (P=0,0048) e a distribuição dos dados está representada no Gráfico 3.

Tabela 9 - Valores percentuais das células CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, PG68A⁺, CD45⁺ e a razão entre as porcentagens de células CD4⁺/CD8⁺ no leite de caprino Saanen em relação aos grupos experimentais – São Paulo 2011

		CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	PG68A ⁺ (%)	CD14 ⁺ (%)	CD45 ⁺ (%)
AEC-	Média	0,58	3,13 ^a	0,27	25,23 ^a	10,39 ^b	57,43 ^a
	Desvio Padrão	(± 1,01)	(± 3,44)	(± 0,34)	(± 17,33)	(± 2,30)	(± 25,90)
	Mediana	0,33 ^a	2,08	0,20 ^a	23,10	9,65	58,55
	Mín-Máx n	(0,03-4,25) 16	(0,11-13,20) 16	(0,01-1,40) 16	(4,17-58,20) 16	(8,09-14,30) 16	(15,5-95,6) 16
AEC+	Média	0,96	1,67 ^a	0,63	25,42 ^a	16,46 ^a	68,10 ^a
	Desvio Padrão	(± 1,30)	(± 0,82)	(± 0,76)	(± 11,88)	(± 5,052)	(± 19,13)
	Mediana	0,56 ^a	1,76	0,31 ^a	27,10	14,35	71,05
	Mín-Máx n	(0,05-5,08) 17	(0,00-3,13) 17	(0,04-2,48) 17	(8,44-46-80) 17	(10,9-26,2) 18	(26,5-93,0) 18
P		0,10	0,12	0,11	0,97	0,0048	0,18

AEC: Artrite Encefalite Caprina

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05)

Gráfico 3 - Representação gráfica em box-plot da frequência de células $CD14^+$ no leite das cabras subdivididas em dois grupos: não sororreagente ao vírus (AEC-) e sororreagente ao vírus (AEC+) – São Paulo – 2011

8 DISCUSSÃO

O presente estudo constatou alterações na imunofenotipagem, exclusivamente nos leucócitos lácteos CD14⁺, que aumentou nos animais sororreagentes. Cabe lembrar que garantiu-se a homogeneidade dos grupos, pois ambos foram negativos no exame bacteriológico, equivalentes em relação ao número de lactações, idade e fases da lactação, e com valores hematológicos dentro dos valores de referência para a espécie, raça e sistema de produção. Os animais dos dois grupos também apresentaram CCS semelhantes tanto quando aferidas automaticamente quanto por microscopia. Tornando essa variação potencialmente atribuível à infecção pelo VAEC e sua constatação ainda mais perturbadora por estar associada ao aumento nos teores de proteína, também no grupo sororreagente.

O fator mais importante que alteraria quantitativa e qualitativamente a celularidade do leite seria a infecção bacteriana no úbere, que comprovadamente aumenta a migração de células para o local (CONTRERAS et al., 2007), o que foi excluído no presente estudo por dois exames bacteriológicos seriados.

Sabe-se que o vírus pode infectar células epiteliais (MSELLI-LAKHAL et al., 1999), e dessa forma acredita-se que pode haver modificação no padrão de secreção láctea. Assim, os animais do grupo sororreagente ao vírus, que tiveram maiores valores de proteína, e consequentemente maior valor de extrato seco desengordurado podem ter sido alvo da ação viral local. Outros estudos que trabalharam com o vírus não encontraram essa alteração (NORD; ADNOY, 1997), ou ainda encontraram esses valores menores nos animais sororreagentes (TURIN et al., 2005; BIRGEL JUNIOR et al., 2007; KABA et al., 2012). É interessante ressaltar que no trabalho de Birgel Junior et al. (2007), só apresentaram menor proteína láctea, os animais sororreagentes com endurecimento do úbere, grupo este que não foi incluído no presente estudo.

Vários fatores podem levar a aumento da proteína no leite, entre eles fatores nutricionais e inflamatórios. Em mastites bacterianas, a inflamação na glândula é responsável pela diminuição na produção láctea e aumento dos valores de proteína total no leite (LEITNER; MERIN; SILANIKOVE, 2004). Como supra mencionado, no presente estudo só foram utilizados animais sem infecção bacteriana, e com o mesmo manejo

nutricional, o que assegura maior confiança aos resultados encontrados. Os autores que encontraram redução de proteína nos animais sororreagentes, não buscaram observar a presença de bactérias no leite (TURIN et al., 2005), ou a influência dessa variável foi excluída por modelo estatístico (KABA et al., 2012).

Outros estudos mostram que a menor produção láctea é associada a um aumento da proteína no leite (GOETSCH; ZENG; GIPSON, 2011). Vários estudos já demonstraram que a AEC é um fator que pode diminuir a capacidade de produção do animal (PETERHANS et al., 2004; LEITNER et al., 2010). No presente estudo não foi avaliada a produção láctea quantitativamente, mas acredita-se que essa redução ocasionada pelo vírus possa ocorrer, justificando o aumento da proteína no leite. O presente estudo não objetivou avaliar a composição do leite de cabras sororreagentes, ela só foi avaliada para verificar a homogeneidade dos grupos e essa constatação acabou tornando-se interessante.

Quando se avaliou a variação celular, o presente estudo não houve diferença no fenótipo dos principais tipos celulares no sangue de caprinos. As porcentagens de neutrófilos e monócitos não diferiram como já fora anteriormente descrito por Wilkerson et al. (1995), Ponti et al. (2008) e Kaba et al. (2011), mas diferem dos resultados encontrados por Joly et al. (1997).

Em seu estudo, Joly et al. (1997) encontraram menor porcentagem de monócitos no grupo infectado e atribuíram essa diminuição ao fato de ser essa população o alvo principal de infecção do vírus. Para a realização de seu estudo, os autores utilizaram o anticorpo anti-GM1, um marcador de monócitos e granulócitos, e fizeram separação celular. Os estudos posteriores, bem como o presente estudo, trabalharam com o anticorpo anti-CD14 e sem separação celular, e não encontraram essa diminuição, mas descreveram porcentagens semelhantes nos dois grupos estudados.

As subpopulações de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$, também se apresentaram semelhantes nos dois grupos, bem como a proporção $CD4^+/CD8^+$. Este mesmo resultado foi encontrado por Wilkerson et al. (1995) e por Grezel et al. (1997) mas difere de outros pesquisadores.

Jolly et al. (1997), trabalhando com infecção experimental, descreveram o vírus como imunossupressor, pois encontraram nos animais infectados menor quantidade de linfócito T $CD4^+$ em relação aos animais saudáveis, e conseqüentemente menor relação

CD4⁺/CD8⁺. Este *status* considerado por eles como imunossupressor, é o mesmo encontrado em outras lentivirose como a SIDA e a FIV, (HAASE, 1986; GEORGE; PEDERSEN; HIGGINS, 1993; LEVY, 1993; PALLELA JUNIOR et al., 1998; MCMICHAEL, ROWLAND-JONES, 2001; PATEL et al., 2012) mas difere dos resultados encontrados neste experimento e de outros estudos que investigaram a AEC (PONTI et al., 2008; KABA et al., 2011).

Ponti et al. (2008) também encontraram menor relação CD4⁺/CD8⁺ nos animais infectados pelo VAEC, porém, caracterizado pelo aumento da porcentagem de linfócitos T CD8⁺, e não pela diminuição das células CD4⁺. O mecanismo responsável por essa alteração não é conhecido, mas os autores sugerem que o aumento dessas células possa ter um papel protetor, por seu efeito citotóxico.

Em um estudo mais recente, com animais infectados por pelo menos dois anos, Kaba et al. (2011) encontraram aumento nas porcentagens dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. Este grupo de pesquisadores acredita que as maiores porcentagens destas células possa ter ocorrido pelo constante estímulo imunológico causado pela infecção crônica. Esta assertiva não pode ser confirmada no presente estudo por que a população não foi acompanhada por um período mais longo para garantir o tempo de infecção da doença. É possível que os animais estudados encontravam-se em vários períodos da infecção, o que pode justificar a ausência de identificação do aumento dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ neste experimento. Grezel et al. (1997) trabalharam com 127 animais em um rebanho com 75 % de animais infectados, sem determinação do tempo de infecção, e também não encontraram diferenças entre as porcentagens das subpopulações de linfócito T.

O que muitos autores concordam é que o VAEC não pode ser considerado imunossupressor em relação ao padrão fenotípico celular, diferentemente de outros vírus do mesmo gênero, pois grande parte dos estudos não encontraram modificação no fenótipo dos linfócitos T no sangue de caprinos infectados pelo vírus (WILKERSON et al., 1995; GREZEL et al., 1997;) ou encontraram as porcentagens destas células aumentadas (PONTI et al., 2008; KABA et al., 2011). Jolly et al. (1997) referiram menor quantidade destas células, mas empregaram um número pequeno de animais (cinco animais em cada grupo), em infecção experimental e o resultado estatístico encontrado não foi significativo (P=0,07).

A marcação por citometria de fluxo das células do leite é uma técnica ainda pouco utilizada em caprinos. Alguns autores descreveram o método (GUIGUEN et al., 1996; WINNICKA et al., 1999; LEITNER et al., 2010), mas não há um padrão bem definido para as análises. Por não conseguir demarcar a população de macrófagos no leite em todas as amostras obtidas, como descreveram Winnicka et al. (1999), optou-se pela marcação dos leucócitos no leite, utilizando o anticorpo anti-CD45, e posteriormente a marcação dos fagócitos com o anticorpo anti-CD14.

Em relação aos linfócitos e neutrófilos, foi possível demarcar a população, como proposto por Winnicka et al. (1999), e posteriormente marcou-se com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, objetivando a identificação da população de linfócitos, e com o marcador de PG68A para os neutrófilos.

Considerou-se polimorfonucleares, no caso neutrófilos, baseando-se no marcador destas células em suínos, o PG68A¹¹, descrito por Leitner et al. (2011). Esta avaliação foi anteriormente validada em um estudo piloto com este anticorpo que antecedeu o presente estudo. Separou-se as células por gradiente de concentração em mononucleares e polimorfonucleares, com mais de 90 % de pureza em cada grupo celular identificado por microscopia ótica. O anticorpo marcou os polimorfonucleares e não marcou os mononucleares, e desta forma foi utilizado neste experimento.

O presente estudo não encontrou diferença quanto as porcentagens de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e de neutrófilos (PG68A⁺), mas encontrou diferença altamente significativa ($P < 0,01$) relacionada às células CD45⁺/CD14⁺. As porcentagens destas células foram maiores em animais naturalmente infectados pelo vírus.

A técnica empregada difere da utilizada por Ponti et al. (2008) que empregaram anticorpo anti-CD14 e a marcação de linfócitos sem utilizar um anticorpo que marcasse todos os leucócitos e nem demarcar a população de linfócitos. Neste trabalho, a equipe de pesquisadores descreveram maior porcentagem de linfócitos T CD8⁺ no leite de caprinos infectados, e menor porcentagem de fagócitos CD14⁺, divergindo nestes aspectos dos resultados encontrados no presente trabalho. Estes autores acreditam que o aumento de

¹¹ VMRD, Pullman, EUA – catálogo PG68A

células CD8⁺ no leite pode ser reflexo de uma imunidade citotóxica específica do organismo respondendo ao aumento do vírus na glândula.

As células CD14⁺ são classicamente caracterizadas em caprinos como monócitos e macrófagos (WINNICKA et al., 1999; BOULAABA; GRABOWSKI; KLEIN, 2011). Sabe-se que os neutrófilos do leite de bovinos também podem expressar CD14 (SLADEK; RYSANEK; FALDYNA, 2002), mas estudos que comprovem essa informação em caprinos não foram encontrados. Em um projeto piloto realizado pela presente equipe com separação celular e mais de 90 % de pureza nas células polimorfonucleares, apenas 2 % das células foram CD14⁺.

Dessa forma, acredita-se que as células CD14⁺ no leite caprino sejam predominantemente macrófagos, as células alvo do VAEC (NARAYAN et al., 1982; GENDELMAN et al., 1985; GENDELMAN et al., 1986; CLEMENTS; ZINK, 1996) . Os animais sororreagentes apresentaram maior porcentagem de células CD14⁺.

Sabe-se que o VAEC pode alterar a expressão de algumas citocinas pelos macrófagos. Em um estudo *in vitro*, Lechat et al. (1997) demonstraram que os macrófagos infectados produziram mais MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), que é um quimioatrativo de monócitos/macrófagos. Sendo assim, o próprio macrófago infectado pode ser o responsável pela atração de mais monócitos/macrófagos para a glândula mamária e sua consequente identificação no leite.

Lerondelle, Richard e Issartial (1992) trabalharam com a influência do VAEC nas células somáticas do leite, e encontraram um pequeno aumento na contagem das glândulas mamárias de animais infectados. Estes autores acreditam que a variação encontrada seja devido ao afluxo de macrófagos para o leite. Outros autores também relatam pequenos aumentos nos grupos infectados pelo vírus (NORD; ADNOY, 1997; SANCHEZ et al., 2001; TURIN et al., 2005; BIRGEL JUNIOR et al., 2007; GOMES et al., 2011) e alguns autores, bem como o presente estudo não encontraram diferenças relacionadas a celularidade (LUENGO et al., 2004; LEITNER et al., 2010; SANTOS et al., 2011; KABA et al., 2012).

Essa variedade de achados confirma a hipótese levantada por Lerondelle, Richard e Issartial (1992) e proposta no presente estudo, de que existe afluxo de macrófagos para a glândula infectada. Mas, como o macrófago não é a célula predominante no leite de cabras sadias, o aumento proporcional é pequeno, e muitas vezes mascarados por variações

fisiológicas, diferentemente de quando ocorre afluxo de neutrófilos mobilizados por infecções bacterianas.

Capítulo 2. Fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio pelas células do sangue e leite de cabras naturalmente infectadas pelo vírus da artrite encefalite caprina

9 APRESENTAÇÃO

A artrite encefalite caprina é uma doença viral, infecto-contagiosa, multissistêmica e muito difundida, descrita em todo território nacional (LEITE et al., 2004; BANDEIRA et al., 2009; MOURA SOBRINHO et al., 2010). A compreensão das suas diversas manifestações e da sua cadeia epidemiológica ainda encontram informações conflitantes em diversos aspectos. No caso da interferência mamária, as implicações do vírus da artrite encefalite caprina (VAEC) apresentam três aspectos fundamentais. No primeiro aspecto ter-se-ia a manifestação mamária primária, representada pela mastite endurativa (LARA et al., 2005). No segundo aspecto haveria a importância que a glândula mamária representa como via de eliminação do vírus no colostro e no leite, independentemente da manifestação da mastite endurativa (CRAWFORD; ADAMS, 1981; ADAMS et al., 1983; EAST et al., 1987). E, como terceiro aspecto, estaria a possibilidade da doença, sob a forma sistêmica e/ou mamária, alterar a susceptibilidade do animal a outras doenças como já descrito em afecções similares (ROILIDES et al., 1990; ELBIN et al., 1994; PITRAK et al., 1996; PITRAK, 1997; PUGLIESE et al., 2005).

Considerando a possibilidade de co-morbidade, não há consenso em relação a mastite bacteriana. Há descrições do VAEC como fator predisponente para mastite bacteriana, associando maior índice de mastite aos animais sororreagentes ao vírus (SMITH; CUTLIP, 1988; RYAN; GREENWOOD; NICHOL, 1993), como também estudos nos quais essa relação não foi encontrada (SANCHEZ et al., 2001; SANTOS et al. 2011).

Apesar dessas contradições encontradas nos estudos que trabalharam com a interferência do VAEC *in vivo*, trabalhos *in vitro* demonstraram que o vírus altera as interações em nível celular. Os pesquisadores observaram que o padrão das citocinas produzidas por macrófagos infectados é diferente do produzido por células provenientes de animais saudáveis (LECHNER et al., 1997). Quando estas células são estimuladas com algum tipo de antígeno, como o LPS, o padrão de resposta inflamatória de citocinas também difere neste grupo (WERLING; LANGHANS; GEARY, 1994). Cabe ressaltar aqui que a imunidade inata do úbere, principalmente desempenhada pelos macrófagos e neutrófilos representa primeira linha de defesa contra patógenos que invadem o canal do teto (PAAPE; CAPUCO, 1997; SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DeROSA, 1997).

Os macrófagos infectados *in vitro* produziram maior quantidade de MCP-1 e IL-8 (LECHNER et al., 1997). O MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1* – Proteína 1 quimioatraente de monócito) é uma quimiocina capaz de atrair monócitos e linfócitos T para o local recrutado (CARR et al., 1994). Quando liberada pelos macrófagos, esta pode ser responsável por atrair as células mononucleares para o úbere causando a mastite endurativa, ou ainda, ser a responsável por maior liberação de macrófagos infectados para a disseminação do vírus através do leite e/ou colostro.

A outra citocina produzida pelos macrófagos infectados é a IL-8 (Interleucina 8), uma quimiocina que se caracteriza como potente quimioatraente de neutrófilos (BAGGIOLINI; LOETSCHER; MOSER, 1994). O aumento desta citocina foi relatado também em outras lentivirose como a SIDA em humanos (MATSUMOTO et al., 1993) e o Maedi-Visna em ovinos (LEGASTELOIS et al., 1996). Apesar do aumento de IL-8, não é encontrado um predomínio de neutrófilos nas manifestações clínicas das LVPR, e o significado biológico deste fenômeno ainda não foi elucidado (CLEMENTS; ZINK, 1996; LEGASTELOIS et al., 1996).

Após fagocitarem, as células liberam grânulos com substâncias microbicidas em um processo complexo e altamente eficiente. Dentre estas substâncias as espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo superóxidos, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, assumem grande importância, sendo o principal e mais estudado mecanismo de defesa destas células (DAHLGREN; KARLSSON, 1999; SEGAL, 2005).

Considerando que esses aspectos circunstanciam a hipótese do vírus promover sinalizações celulares e mecanismos imunes que alterem a funcionalmente os próprios monócitos/macrófagos ou mesmo de outros tipos celulares como os neutrófilos, objetivou-se avaliar a influência do VAEC na fagocitose de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e na produção de ERO por monócitos/macrófagos e polimorfonucleares do sangue e do leite de cabras naturalmente infectadas por VAEC.

10 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto desenvolvido foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo em 01 de julho de 2009, protocolado sob o nº 1684/2009.

10.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Os critérios de seleção e formação dos grupos experimentais foram os mesmos apresentados no capítulo 1, itens 6.1 a 6.6 desta dissertação.

10.2 AVALIAÇÃO IMUNITÁRIA

A obtenção das amostras e recuperação das células para o ensaio imunitário foi feita de acordo com a técnica descrita no capítulo 1, itens 6.7 – 6.9 dessa dissertação.

10.2.1 Produção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e fagocitose de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli*

Foram feitos ensaios para a avaliação da produção intracelular de ERO e de fagocitose de *S. aureus* e de *E. coli* por células polimorfonucleares e por células CD14⁺ lácteas e sanguíneas. Estas provas foram realizadas por citometria de fluxo, conforme técnicas empregadas por Hasui, Hirabayashi e Kobayashi (1989), por Smits, Burvenich e Heyneman (1997), Kampem, Tollersrud e Lund (2004) e Kampem et al. (2004) e modificadas de acordo com Azedo et al. (2008).

Foram adicionados 100 µL de suspensão celular láctea ajustada em 2×10^6 células viáveis/mL de cada metade mamária e 100 µL de sangue total de cada animal foram incubados a 37 °C por 30 minutos com 0,3 µM de 2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA)¹² para avaliar a produção intracelular de ERO ou com *Staphylococcus aureus*¹³ ou *Escherichia coli*¹⁴ conjugada com fluoresceína para determinação dos índices de fagocitose. Após o período de incubação, foi adicionado em todos os tubos 2.000 µL de solução gelada de EDTA (3mM) e centrifugado a 250 x g por 8 minutos (4 °C).

Após desprezar o sobrenadante, as hemácias do sangue foram lisadas com solução de Cloreto de Sódio (NaCl) 0,2 % por 20 segundos, e a osmolaridade normal foi restituída com uma solução de NaCl 1,6 %. Estas foram centrifugadas a 250 x g por 8 minutos (4 °C) e a lise foi repetida por mais 2 vezes.

Procedeu-se então a marcação celular. Inicialmente as células foram incubadas com o anticorpo primário *Swine anti- mouse* PG68A¹⁵ do isótipo IgG1 por 30 minutos a 4 °C. Foi feita a lavagem com 1000 µL de PBS gelado e centrifugado a 250 x g por 8 minutos (4 °C). Após desprezar o sobrenadante foi feita a marcação com anticorpo secundário IgG1 RPE-Cy5¹⁶ e com o anticorpo conjugado *Mouse anti human* CD14: RPE-CY5¹⁷ por 30 minutos a 4 °C protegidas da luminosidade. Novamente a lavagem foi feita com 1000 µL de PBS gelado e centrifugado a 250 x g por 8 minutos (4 °C). Após desprezar o sobrenadante as células foram ressuspensas em 300 µL de PBS acrescidos de 0,1% de Albumina Sérica Bovina (BSA¹⁸). As amostras foram adquiridas por citometria de fluxo. Para melhor compreensão o esquema do experimento está relacionado na tabela 10 de acordo com os tubos utilizados.

¹² Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA, n° cat. D6883

¹³ Molecular Probes, Eugene, OR, EUA n° cat. S-2851

¹⁴ Molecular Probes, Eugene, OR, EUA n° cat. E-2851

¹⁵ VMRD, Pullman, EUA, n° cat. PG68A

¹⁶ Invitrogen, Carlsbad, EUA, n° cat. M32018

¹⁷ AbDserotec, Oxford, UK, n° cat. MCA 2804C

¹⁸ INLAB, São Paulo, Brasil, n° cat. 1870

Tabela 10 - Esquema dos tubos utilizados no experimento de fagocitose e produção de ERO de acordo com o objetivo e dos componentes acrescidos a cada tubo – São Paulo – 2011

Tubo	Objetivo	Componentes
A	Calibração	Células
B	Calibração (FL1) – <i>S. aureus</i>	Células+ <i>S. aureus</i>
C	Calibração (FL1) – DCFH	Células + DCFH
D	Calibração (FL1) – <i>E. coli</i>	Células + <i>E. coli</i>
E	Calibração FL3 - Polimorfonucleares	Células + PG68A
F	Calibração FL3 – CD14	Células + CD14
G	Células	Células
H	Fagocitose – <i>S. aureus</i> por células PG68A ⁺	Células + <i>S. aureus</i> + PG68A
I	Fagocitose – <i>S. aureus</i> por células CD14 ⁺	Células + <i>S. aureus</i> + CD14
J	Fagocitose – <i>E. coli</i> por células PG68A ⁺	Células + <i>E. coli</i> + PG68A
K	Fagocitose – <i>E. coli</i> por células CD14 ⁺	Células + <i>E. coli</i> + CD14
L	Produção de ERO por células PG68A ⁺	Células + DCFH + PG68A
M	Produção de ERO por células CD14 ⁺	Células + DCFH + CD14

S. aureus – *Staphylococcus aureus*¹⁹

E. coli – *Escherichia coli*²⁰

DCFH - diclorodihidrofluoresceína diacetato²¹

PG68A - Swine anti- mouse PG68A²² (IgG1) + - IgG1 RPE-Cy5²³

CD14 - Mouse anti human CD14: RPE-CY5²⁴

10.2.2 Análise do sangue

Nas amostras sanguíneas as células foram identificadas por seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Neste painel foram criados *gates* para definir as populações de mononucleares (figuras 11A, 13A) e de granulócitos (figura 12A). Das células caracterizadas como mononucleares foi avaliada a porcentagem de células que expressaram CD14 (figuras 11B, 13B) e das células polimorfonucleares as que expressaram PG68A (figura 12B). Destas células foi avaliada a porcentagem de células que fagocitaram *S. aureus* (figura 11C) *E.coli* (figura 13C), e a porcentagem de células que produziram DCFH (figura 12C).

¹⁹ Molecular Probes, Eugene, OR, EUA nº cat. S-2851

²⁰ Molecular Probes, Eugene, OR, EUA nº cat. E-2851

²¹ Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA, nº cat. D6883

²² VMRD, Pullman, EUA, nº cat. PG68A

²³ Invitrogen, Carlsbad, EUA, nº cat. M32018

²⁴ AbDserotec, Oxford, UK, nº cat. MCA 2804C

Figura 11 - Estratégia utilizada para a identificação das células $CD14^+/S. aureus^+$ no sangue de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos mononucleares utilizando granulocidade (SSC) *versus* tamanho (FSC), (B) Identificação dos mononucleares $CD14^+$ (C) Porcentagem de células $CD14^+$ que fagocitaram *S. aureus* marcada com fluoresceína. São Paulo – 2011

Figura 12 - Estratégia utilizada para a identificação das células $PG68A^+/DCFH^+$ no sangue de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos polimorfonucleares utilizando granulocidade (SSC) *versus* tamanho (FSC), (B) Identificação dos $PG68A^+$ dos granulócitos (C) Porcentagem de células $PG68A^+$ que produziram DCFH. São Paulo – 2011

Figura 13 - Estratégia utilizada para a identificação das células $CD14^+/E.coli^+$ no sangue de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos mononucleares utilizando granulocidade (SSC) *versus* tamanho (FSC), (B) Identificação dos mononucleares $CD14^+$ (C) Porcentagem de células $CD14^+$ que fagocitaram *E. coli* marcada com fluoresceína. São Paulo – 2011

10.2.3 Análise do leite

Nas amostras lácteas as células foram identificadas por seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) (figura 14A). Neste painel foi criado o *gate* dos granulócitos (figuras 15A, 16A) para a marcação de polimorfonucleares PG68A⁺ (figuras 15B, 16B). Do total de células fez-se a marcação de CD14⁺ (figura 14B). Desta população foi avaliada a porcentagem de células que fagocitaram *S. aureus* (figura 15C), *E.coli* (figura 16C) e a porcentagem de células que produziram DCFH (figura 14C).

Figura 14 - Estratégia utilizada para a identificação das células CD14⁺/DCFH⁺ no leite de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Citograma granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC), (B) Identificação dos CD14⁺ do total de células (C) Porcentagem de células CD14⁺ que produziram DCFH. São Paulo – 2011

Figura 15 - Estratégia utilizada para a identificação das células PG68A⁺/*S. aureus*⁺ no leite de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos granulócitos utilizando granulosidade (SSC) versus tamanho (FSC), (B) Identificação dos PG68A⁺ dos granulócitos (C) Porcentagem de células PG68A⁺ que fagocitaram *S. aureus*. São Paulo – 2011

Figura 16 - Estratégia utilizada para a identificação das células PG68A⁺/E. coli⁺ no leite de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos granulócitos utilizando granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC), (B) Identificação dos PG68A⁺ dos granulócitos (C) Porcentagem de células PG68A⁺ que fagocitaram E. coli. São Paulo – 2011

10.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad InStat[®], versão 3.01 para Windows 9537.

Verificou-se a normalidade da distribuição dos resultados, utilizando-se teste de Anderson-Darling.

Para a avaliação das diferenças entre as médias dos resultados obtidos, foram realizados os testes de análise de variância ANOVA One-way (Unstacked) (para dados com distribuição normal) e Mann-Whitney (para dados que não apresentaram distribuição normal). Para todos os resultados, foram consideradas significantes as análises que apresentaram $P \leq 0,05$ e foram consideradas como tendência as amostras que apresentaram o P entre 0,05 e 0,10 (PANTOJA et al., 1996).

11 RESULTADOS

11.1 AVALIAÇÃO IMUNITÁRIA

11.1.1 Produção intracelular de Espécie Reativa de Oxigênio (ERO) e fagocitose de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli*

Os resultados da fagocitose e produção de ERO estão apresentados nas tabelas 11, 12, 13 e 14 a seguir, e estão divididas conforme o a marcação celular (PG68A⁺ ou CD14⁺) e a origem das células (sangue ou leite).

As médias, desvios padrão, mediana e amplitude das porcentagens de fagocitose e produção intracelular de ERO do sangue e das medianas da intensidade de fluorescência das células PG68A⁺ estão apresentados na tabela 11. Não houve diferença entre os grupos experimentais.

Tabela 11 - Valores percentuais e intensidade de fluorescência da produção intracelular de ERO e fagocitose de *S. aureus* e de *E. coli* das células PG68A⁺ do sangue de caprino Saanen em relação aos grupos experimentais - São Paulo 2011

Grupo (n)		Fagocitose de <i>E.coli</i> (%)	Intensidade de fagocitose de <i>E. coli</i> (Valores arbitrários)	Fagocitose de <i>S. aureus</i> (%)	Intensidade de fagocitose <i>S. aureus</i> (Valores arbitrários)	Produção de ERO (%)	Intensidade de produção de ERO (Valores arbitrários)
AEC ⁻ (8)	Média	41,32 ^a	408,08 ^a	46,20 ^a	1527,3 ^a	95,17 ^a	363,88 ^a
	Desvio Padrão	(± 11,1)	(± 585,51)	(± 14,87)	(± 2541,2)	(±8,69)	(± 327,82)
	Mediana	42,55	61,05	48,45	103,95	98,20	273,00
	Mín-Máx	(24,5-54,6)	(10,5-1540)	(16,5-60,9)	(2,19-5981,0)	(73,8-99,3)	(24,7-755,0)
AEC ⁺ (10)	Média	40,51 ^a	370,65 ^a	46,08 ^a	1157,5 ^a	97,52 ^a	308,60 ^a
	Desvio Padrão	(± 13,57)	(± 368,92)	(± 14,86)	(± 2559,6)	(±1,55)	(± 247,57)
	Mediana	39,15	234,50	43,15	78,05	97,95	224,50
	Mín-Máx	(20,9-59,9)	(1,37-820)	(29,1-70,8)	(1,01-8301,0)	(95,2-99,7)	(50,7-750,0)
P		0,89	0,87	0,99	0,76	0,47	0,69

AEC: Artrite Encefalite Caprina

ERO: Espécie Reativa de Oxigênio

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05)

As médias e desvios padrão das porcentagens de fagocitose e produção de ERO e as médias e desvios padrão das medianas da intensidade de fluorescência das células CD14⁺ do sangue estão apresentados na tabela 12. Não houve diferença entre os grupos experimentais.

Tabela 12 – Valores percentuais e intensidade de fluorescência da produção intracelular de ERO e fagocitose de *S. aureus* e de *E. coli* das células CD14⁺ do sangue de caprino Saanen em relação aos grupos experimentais- São Paulo 2011

		Fagocitose de <i>E.coli</i> (%)	Intensidade de fagocitose de <i>E. coli</i> (Valores arbitrários)	Fagocitose de <i>S. aureus</i> (%)	Intensidade de fagocitose de <i>S. aureus</i> (Valores arbitrários)	Produção de ERO (%)	Intensidade de produção de ERO (Valores arbitrários)
AEC-	Média	32,35 ^a	117,99 ^a	23,65 ^a	23,51 ^a	49,47 ^a	56,11 ^a
	Desvio Padrão	(± 18,90)	(± 238,93)	(± 11,72)	(± 22,68)	(±27,90)	(± 67,95)
	Mediana	29,15	20,65	21,12	13,60	48,10	25,27
	Mín-Máx n	(15,1-75,2) 8	(3,0-701,0) 8	(10,1-43,8) 8	(2,73-66,40) 8	(13,4-88,5) 8	(2,29-189) 8
AEC+	Média	24,08 ^a	35,117 ^a	18,54 ^a	32,55 ^a	62,43 ^a	196,57 ^a
	Desvio Padrão	(± 8,71)	(± 36,204)	(± 10,84)	(± 26,33)	(±25,68)	(± 279,88)
	Mediana	23,05	22,70	18,10	30,55	65,15	62,90
	Mín-Máx n	(10,7-34,7) 10	(3,23-111,0) 10	(6,73-43,50) 9	(7,01-86,4) 9	(23,6-91,4) 10	(2,81-848) 10
P		0,28	0,36	0,35	0,46	0,32	0,16

AEC: Artrite Encefalite Caprina

ERO: Espécie Reativa de Oxigênio

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05)

As médias, desvios padrão das porcentagens de fagocitose e produção de ERO e das medianas da intensidade de fluorescência das células PG68A⁺ do leite estão apresentados na tabela 13. Houve diferença na porcentagem de células PG68A⁺ que fagocitaram *S. aureus* entre os grupos experimentais, de forma que a porcentagem do grupo AEC+ foi menor do que do grupo AEC- (P=0,0055).

Tabela 13 - Valores percentuais e intensidade de fluorescência da produção intracelular de ERO e fagocitose de *S. aureus* e de *E. coli* das células PG68A⁺ do leite de caprino Saanen em relação aos grupos experimentais - São Paulo 2011

		Fagocitose de <i>E. coli</i> (%)	Intensidade de fagocitose de <i>E. coli</i> (Valores arbitrários)	Fagocitose de <i>S. aureus</i> (%)	Intensidade de fagocitose de <i>S. aureus</i> (Valores arbitrários)	Produção de ERO (%)	Intensidade de produção de ERO (Valores arbitrários)
AEC-	Média	67,97 ^a	148,88 ^a	64,78 ^b	2896,9 ^a	76,22 ^a	2690,1 ^a
	Desvio Padrão	(±19,26)	(± 139,18)	(± 8,41)	(± 2693,2)	(±18,86)	(± 385,97)
	Mediana	71,65	91,30	65,65	1710,0	80,3	2716,0
	Mín-Máx	(24,70-89,8)	(8,53-385,0)	(50,6-80,5)	(175,0-7148,0)	(35,7-95,6)	(51,6-5511,0)
	n	16	16	14	17	16	16
AEC+	Média	67,56 ^a	247,78 ^a	47,32 ^a	1780,3 ^a	79,09 ^a	2364,2 ^a
	Desvio Padrão	(±6,12)	(± 265,45)	(± 22,11)	(± 2368,3)	(±15,74)	(± 952,5)
	Mediana	70,7	156,5	46,45	732,0	86,1	2454,0
	Mín-Máx	(35,9-94,6)	(6,46-838,0)	(13,8-79,6)	(5,99-7310,0)	(31,6-94,0)	(10,8-4665,0)
	n	16	16	18	18	17	17
	P	0,95	0,19	0,0055	0,22	0,64	0,47

AEC: Artrite Encefalite Caprina

PG68A: Polimorfonucleares

ERO: Espécie Reativa de Oxigênio

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05)

A figura 17 representa a fagocitose de *S. aureus* por células PG68A⁺ do leite de caprinos nos dois grupos experimentais onde a imagem da esquerda (A) demonstra um animal do grupo AEC- e a imagem da direita um animal do grupo AEC+.

Figura 17 - Porcentagem de células PG68A⁺ que fagocitaram *S. aureus* marcada com fluoresceína no leite de caprinos do grupo AEC+ (A) e do grupo AEC- (B)

As médias, desvios padrão, mediana e amplitude das porcentagens de fagocitose e produção de ERO, e das medianas da intensidade de fluorescência das células CD14⁺ do leite estão apresentados na tabela 14. Não houve diferença entre os grupos experimentais.

Tabela 14 - Valores percentuais e intensidade de fluorescência da produção intracelular de ERO e fagocitose de *S. aureus* e de *E. coli* das células CD14⁺ do leite de caprino - São Paulo 2011

		Fagocitose de <i>E. coli</i> (%)	Intensidade de fagocitose de <i>E. coli</i> (Valores arbitrários)	Fagocitose de <i>S. aureus</i> (%)	Intensidade de fagocitose de <i>S. aureus</i> (Valores arbitrários)	Produção de ERO (%)	Intensidade de produção de ERO (Valores arbitrários)
AEC-	Média	44,83 ^a	142,30 ^a	32,23 ^b	723,79 ^a	30,79 ^a	22,17 ^a
	Desvio Padrão	(± 31,57)	(± 126,63)	(± 16,50)	(± 1646,3)	(±10,17)	(± 12,54)
	Mediana	29,05	145,0	30,40	149	33,1	10,03
	Mín-Máx	(6,05-99,20)	(1,06-31,66)	(11,2-64,1)	(1,01-6016)	(14,5-48,8)	(1,29-19,5)
	n	16	16	15	15	16	16
AEC+	Média	37,94 ^a	100,85 ^a	33,62 ^a	658,53 ^a	30,95 ^a	25,86 ^a
	Desvio Padrão	(± 25,58)	(± 105,19)	(± 18,79)	(± 1514,4)	(±14,48)	(± 22,38)
	Mediana	29,55	84,5	30,50	141,0	30,0	13,5
	Mín-Máx	(8,40-98,20)	(1,01-438,0)	(7,34-68,8)	(1,26-6186)	(4,64-54,0)	(3,78-21,6)
	n	18	18	17	17	18	18
	P	0,49	0,30	0,83	0,91	0,97	0,55

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05)

12 DISCUSSÃO

A influência do VAEC à função fagocítica e o mecanismo microbicida dos fagócitos de caprinos, representaria não apenas a interferência da infecção às células alvo (monócitos), mas também às células dependentes da sinalização promovida pelas demais, no caso, os neutrófilos.

O presente estudo não encontrou diferença na fagocitose de bactérias gram positivas e gram negativas *ex vivo* e na produção de ERO das células CD14⁺ e PG68A⁺ do sangue de caprinos naturalmente infectados pelo VAEC, bem como nas células CD14⁺ lácteas. Entretanto, foram as células PG68A⁺ lácteas que fagocitaram *S. aureus* em menor proporção, diferença esta que não ocorreu no ensaio que avaliou essa função para uma bactéria gram negativa.

Existem alguns estudos sobre a fenotipagem de leucócitos no sangue e leite de caprinos infectados pelo VAEC que foram discutidos no capítulo anterior a esse, porém o número de trabalhos que avaliaram a interferência deste vírus na função de fagócitos do sangue é muito restrito, e não foi encontrado nenhum estudo que trabalhou com a função destas células no leite.

Os resultados encontrados no sangue foram concordes com Anderson, Klevjer-Anderson e Liggitt (1983) trabalhando fagocitose de partículas de latex com cultura de monócitos e infecção *in vitro*. Esses autores também não encontraram alteração na função fagocítica de macrófagos derivados de monócitos em infecção recente pelo vírus – de 4 a 7 dias.

Da mesma forma, Sanches (2008) não encontrou diferenças nas porcentagens de macrófagos derivados de monócitos infectados pelo VAEC fagocitando *Mycobacterium pseudotuberculosis*. A pesquisadora encontrou diferença na intensidade de fagocitose, observando que macrófagos do grupo sororreagente fagocitaram maior número de bactérias. Essa diferença não foi observada no presente estudo com as bactérias utilizadas.

A não alteração das funções fagocíticas das células do sangue pode ser explicada pelo fenômeno “cavalo de tróia”, já que o monócito carrega o pró-vírus, que nesta forma se mantém inaparente ao sistema imune (PELUSO et al., 1985). Quando o monócito atinge o

órgão alvo, investigado no presente estudo pela glândula mamária, se diferencia em macrófago e o vírus inicia a sua replicação.

O que se esperava era determinar alguma alteração funcional nesta célula, porém o presente estudo não encontrou diferença na função fagocítica e na produção de ERO das células CD14⁺ lácteas infectadas. Neste cenário vale ressaltar que a marcação com o anticorpo anti-CD14 foi feita após o ensaio de fagocitose, e que a expressão (CD14m) e liberação (CD14s) deste receptor sofrem aumento (*upregulation*) induzido por ligantes de bactérias (LANDMANN; MULLER, ZIMMERLI, 2000).

A produção de ERO pelos fagócitos assume importante função na defesa da glândula (DAHLGREN; KARLSSON, 1999; SEGAL, 2005). No presente estudo mensurou-se a influência do vírus na produção basal dessas importantes substâncias microbidas, mas não encontrou-se diferença em nenhum grupo celular.

Inesperadamente, as células que sofreram alteração nos animais sororreagentes ao vírus foram os polimorfonucleares (PG68A⁺), que fagocitaram *S. aureus* em menor proporção. A infecção viral não alterou a fagocitose de *E. coli* nem a produção de ERO destas células.

Os polimorfonucleares não são as principais células alvo de infecção viral e não são as células predominantes nos infiltrados celulares nas manifestações clínicas da AEC (NARAYAN et al., 1982; CLEMENTS; ZINK, 1996; LEGASTELOIS et al., 1996; RYAN et al., 2000) mas interagem com as outras células presentes na glândula mamária, inclusive com os macrófagos infectados pelo vírus (PAAPE; CAPUCO, 1997; SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DeROSA, 1997). Estas interações ocorrem através de mediadores inflamatórios, a exemplo das citocinas (CARR et al., 2004; BAGGIOLINI; LOETSCHER; MOSER, 1994). Estudos comprovam que o VAEC pode alterar o padrão de citocinas expressas por macrófagos (WERLING; LANGHANS; GEARY, 1994; LECHNER et al., 1997).

Na SIDA já está comprovado que a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana pode alterar a função de neutrófilos, mesmo esta célula não sendo o alvo principal do vírus. Muitos pesquisadores correlacionam esta disfunção celular com alterações no padrão de citocinas presentes ou ainda com a aceleração da apoptose induzida pelo vírus (ROILIDES et al., 1990; ELBIN et al., 1994; PITRAK et al., 1996; PITRAK, 1997; PUGLIESE et al., 2005).

Acredita-se que se a diminuição na taxa de fagocitose por neutrófilos provenientes de animais sororreagentes ao vírus, observada *ex vivo* no presente estudo, possa ocorrer *in vivo*, e ocasionar uma predisposição dos animais infectados à mastite. Essa susceptibilidade já foi verificada por pesquisadores que avaliaram as duas doenças concomitantes (SMITH; CUTLIP, 1988; RYAN; GREENWOOD; NICHOLLS, 1993), porém esta observação não é unânime (SANTOS et al., 2011).

No trabalho de Sanchez et al. (2001), eles não perceberam aumento da prevalência de casos de mastite em animais sororreagentes ao VAEC, mas relataram que quando estes animais tinham infecção intramamária persistente, não houve aumento significativo na contagem de células somáticas (CCS) no leite como houve em animais não sororreagentes ao vírus. O esperado era que o aumento da CCS fosse maior nos animais infectados, acreditando que houvesse uma somatória do efeito do vírus e da bactéria. Eles acreditam que esse aumento não ocorre, pois existe uma falha no sistema imune causada pela redução da produção de mediadores celulares dos macrófagos devido a infecção viral.

Pelo resultado do presente estudo pode-se observar diferença na fagocitose de *S. aureus* e de *E. coli* por células polimorfonucleares provenientes de animais infectados pelo vírus. Houve menor taxa de fagocitose de *S. aureus*, e a proporção de células fagocitando *E. coli* foi a mesma nos dois grupos estudados.

Esta falha de resposta contra um agente específico e não contra outro, pode ocorrer devido às interações celulares onde o VAEC altera os padrões de citocinas liberadas pelos macrófagos, e assim as defesas celulares da glândula mamária estejam mais susceptíveis a infecções por patógenos específicos. Dessa forma a bactéria predominante nos rebanhos estudados pode interferir na associação da AEC e da mastite, justificando a variedade de resultados encontrados.

Já foi observado em ovelhas que diferentes espécies bacteriana causadoras de mastite, podem levar a produção de diferentes citocinas (PERSSON-WALLER; COLDITZ; SEOW 1997). Dessa forma disfunções na produção desta molécula pelo macrófago infectado, pode ser responsável pelo prejuízo na função fagocítica de neutrófilos, determinados no presente estudo especificamente contra bactérias gram positivas.

A diversidade nos resultados dos estudos da influência do vírus *in vivo* na glândula é imensa, o que sugere a grande quantidade de fatores envolvidos nessa resposta. A espécie bacteriana é um deles, que a partir do presente estudo deve ser mais valorizado.

Capítulo 3. Avaliação da apoptose e necrose das células mononucleares e dos granulócitos do sangue e do leite de animais naturalmente infectados pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina

13 APRESENTAÇÃO

A imunidade inata, considerada fundamental para a higidez da glândula mamária, é composta por barreiras físicas, químicas e celulares. Esta última formada principalmente por células residentes como macrófagos e neutrófilos (PAAPE; CAPUCO, 2007; BLAGITZ et al., 2011). Muitos fatores podem ser relacionados ao prejuízo funcional dessas células e já foram descritos, principalmente para a espécie bovina (BLAGITZ, 2011; PESSOA et al., 2012).

BLAGITZ et al. (2011) referiram ser a compreensão dos mecanismos de morte dos neutrófilos lácteos caprinos, fundamental para avaliação do equilíbrio do ciclo celular. Esses autores consideraram que os mecanismos de morte devem ser considerados, inclusive quanto a sua interferência em indicadores de produção e qualidade de leite caprino como, por exemplo, a contagem de células somáticas.

Nas espécies ruminantes, estes tipos de mecanismos de morte celular têm sido correlacionadas com diversos patógenos na mastite, e na relação com a contagem de células somáticas (CCS) no leite de cabras e vacas (MEHRZAD et al., 2004; BLAGITZ et al., 2011; PESSOA et al., 2012).

Seguindo essa linha de raciocínio, pode-se considerar a possibilidade do VAEC interferir nos mecanismos de morte. No capítulo anterior foi observada a interferência do VAEC na função fagocítica de *S. aureus* por células PG68A⁺. A fagocitose por princípio antecede a morte de alguns neutrófilos e pode definir o tipo de morte em voga (VAN OOSTVELDT et al., 2002).

Além do estímulo local descrito nas mastites, alterações sistêmicas de origem viral também podem apresentar relação com a definição do padrão de morte celular.

O vírus da artrite encefalite caprina (AEC) também já foi descrito como indutor de apoptose em células infectadas *in vitro*. A apoptose destas células ocorre pela via intrínseca, ou seja, ocorrem alterações na própria célula que estimulam a mitocôndria a iniciar o estímulo para a morte (REA-BOUTROIS et al., 2008; REA-BOUTROIS et al., 2009). O mesmo foi encontrado em células infectadas com o vírus do maedi-visna (DUVAL et al., 2002; BELLET; DELEBASSÉE; BOSGIRAUD, 2004).

Muitos vírus também influenciam na regulação e homeostase dos processos de morte celular. O vírus da leucose enzoótica bovina é um deles, que diminui a apoptose de linfócitos B ao mesmo tempo que estimula a proliferação destas células levando a uma linfocitose persistente (SOUZA et al., 2011). Outros vírus induzem a apoptose como é o caso do herpesvírus caprino (PAGNINI et al., 2005), herpesvírus bovino (HANNON et al., 1998), pestevírus dos pequenos ruminantes (MONDAL et al., 2001), vírus da diarreia viral bovina (ZHANG et al., 1996) e nos humanos, o vírus da SIDA (PITRAK, 1997).

Outra importante lentivirose, a SIDA, apresenta relatos que a correlacionam com alterações no padrão de citocinas presentes ou ainda com a aceleração da apoptose induzida pelo vírus (ROILIDES et al., 1990; ELBIN et al., 1994; PITRAK et al., 1996; PITRAK, 1997; SALMEN et al., 2004; PUGLIESE et al., 2005).

Nesse cenário, cabe ressaltar que a morte de uma célula ou de um grupo celular não é somente benéfica, mas é requerida para a manutenção da homeostase de um indivíduo jovem ou adulto. A morte celular fisiológica foi inicialmente denominada de “morte programada das células” e depois de apoptose (AMARANTE-MENDES, 2010). Apoptose é um termo originado do grego, sugerido por Kerr, Wyllie e Currie (1972), que nesta língua significa a queda das pétalas das flores ou das folhas das árvores.

Atualmente se conhece vários tipos de morte celular e para evitar confusões o “*Nomenclature Committee on Cell Death*” (Comitê de nomenclatura em morte celular) desenvolveu um guia para orientar autores quanto às denominações corretas. De acordo com o comitê, existem 12 modalidades de morte celular caracterizadas pela morfologia das células, onde quatro são reconhecidas como típicas e oito como atípicas. As quatro típicas têm seus mecanismos bem descritos, são representadas por apoptose, autofagia, necrose e cornificação (KROEMER et al., 2009).

A apoptose e a necrose têm sido muito estudadas em várias espécies. A apoptose é um mecanismo de morte muito bem orquestrado, que apresenta características morfológicas e que termina com a fagocitose dos corpúsculos apoptóticos e sem liberação de fatores inflamatórios e danos ao tecido vizinho (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). A apoptose, atualmente, não é sinônimo de morte celular programada, pois esta última pode assumir características morfológicas não apoptóticas (KROEMER et al., 2009).

A necrose foi inicialmente descrita como um processo aleatório e incontrolável em que o citoplasma das células é liberado estimulando a inflamação nos tecidos, porém

atualmente já se aceita a ideia de que a necrose também seja um processo que sofre uma sequência organizada e em alguns casos pode ser considerado programado (GOLSTEIN; KROEMER, 2006; KRYSKO et al., 2008).

Além do extenso estudo dos processos de morte nas doenças oncológicas, sabe-se que a interferência destes processos pode levar a diminuição das funções celulares de fagócitos como a explosão respiratória, fagocitose e quimiotaxia, predispondo o indivíduo a outras infecções (WHYTE et al., 1993; PITRAK, 1997; VAN OOSTVELDT et al., 2002).

Não foram encontrados estudos *ex vivo* dos mecanismos de morte induzidos pelo VAEC, portanto o objetivo do presente estudo foi de avaliar a apoptose e necrose de células mononucleares e de granulócitos do sangue e leite de caprinos naturalmente infectados pelo VAEC, na ausência de infecção bacterina.

14 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto desenvolvido foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo em 01 de julho de 2009, protocolado sob o nº 1684/2009.

14.1 ANIMAIS UTILIZADOS

Os critérios de seleção e formação dos grupos experimentais foram os mesmos apresentados no capítulo 1, itens 6.1 a 6.6 desta dissertação.

14.2 AVALIAÇÃO IMUNITÁRIA

A obtenção das amostras e recuperação das células para o ensaio imunitário foi feita de acordo com a técnica descrita no capítulo 1, itens 6.7 – 6.9 dessa dissertação.

14.3 MORTE CELULAR

Para o ensaio de morte celular por apoptose empregou-se a Anexina V-FITC²⁵. Para avaliar as células que estavam em processo de morte celular por necrose, utilizou-se o iodeto de propídio (PI). Estes procedimentos foram conduzidos segundo as técnicas

²⁵ APOPTESTTM-FITC, Dako Cytomation, Finlândia, nº cat. K2350

empregadas por Vermes, Haanen e Reutelingsperger (1995) e utilizadas em caprinos por Blagitz et al. (2011).

Nas amostras sanguíneas as hemácias foram lisadas com solução de Cloreto de Sódio (NaCl) 0,2 % por 20 segundos, e a osmolaridade normal foi restituída com uma solução de NaCl 1,6 %. Estas foram centrifugadas a 250 x g por 8 minutos (4 °C) e a lise foi repetida por mais duas vezes. Após a lise realizou-se uma lavagem nas células com 1000 µL de tampão de ligação²⁶. Em relação às amostras lácteas foram adicionados 100 µL de suspensão celular e 1.000 µL de tampão de ligação para a lavagem das celular.

Posteriormente, todas as amostras, de leite e sangue, foram submetidas à centrifugação a 250 x g por 8 minutos (4 °C), subsequentemente, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 100 µL de solução de tampão de ligação. Foi adicionado 1 µL de Anexina V-FITC. Em seguida, as amostras foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luminosidade. Realizou-se nova lavagem sob as mesmas condições da primeira. Foi acrescido 300 µL de tampão de ligação e, imediatamente antes de adquirir as amostras foram adicionados 2,5 µg de Iodeto de Propídio e as amostras foram adquiridas pelo citômetro de fluxo.

Em um dos tubos contendo amostras de sangue e outro de leite foi realizada a marcação com o anticorpo CD14. Sendo assim, após a lavagem para a retirada da anexina foi acrescido o anticorpo conjugado *Mouse anti-human* CD14: RPE-CY5²⁷ por 30 minutos a 4 °C, protegidas da luminosidade. Novamente a lavagem foi feita com 1000 µL de PBS gelado e centrifugado a 250 x g por 8 minutos (4 °C). Após desprezar o sobrenadante as células foram ressuspendidas em 300 µL de PBS acrescidos de Albumina Sérica Bovina (BSA²⁸). As amostras foram adquiridas por citometria de fluxo. Para melhor compreensão a discriminação dos tubos e respectivos conteúdos está realcionada na tabela 15.

²⁶ 10 mM Hepes/150 mM NaCl/ 1 mM MgCl₂/ 1,8 mM CaCl₂

²⁷ AbDserotec, Oxford, UK, n° cat. MCA 2804C

²⁸ INLAB, São Paulo, Brasil, n° cat. 1870

Tabela 15- Discriminação dos tubos e respectivos conteúdos utilizados no experimento de morte celular – São Paulo - 2011

Tubo	Objetivo	Componentes
A	Calibração	Células
B	Calibração FL1	Células + Anexina
C	Calibração FL3 (PI)	Células + PI
D	Calibração FL3 (CD14)	Células + CD14
E	Experimento Apoptose + Necrose	Células + Anexina + PI
F	Experimento Apoptose das células CD14 ⁺	Células + Anexina + CD14

14.1 ANÁLISE DA CITÔMETRIA DE FLUXO

A porcentagem de células mononucleares e de granulócitos positivas para Anexina-V e/ou para o PI foram analisadas no *software Flow Jo*²⁹. No sangue primeiramente foram criados *gates* para definir as populações de mononucleares e de granulócitos (figura 18A) e posteriormente estas células foram analisadas em gráfico de dupla marcação quanto a expressão de Anexina-V e/ou PI (figuras 18B e 18C).

²⁹ *Treestar* – Versão 7.6.1 para Windows.

Figura 18 – Estratégia utilizada para a identificação dos processos de morte das células mononucleares e granulócitos no sangue de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos granulócitos e mononucleares utilizando granulocidade (SSC) *versus* tamanho (FSC). (B) Porcentagem de granulócitos positivos para Anexina (FL1) e PI (FL3). (C) Porcentagem células mononucleares que apresentaram Anexina (FL1) e PI (FL3) - São Paulo – 2011

Para a análise das células $CD14^+$ positivas para Anexina-V no sangue, primeiramente criou-se um *gate* para definir a população de mononucleares (figura 19A) e posteriormente as células positivas ao CD14 (figura 19B). Estas células foram analisadas quanto à expressão de Anexina-V (figura 19C).

Figura 19 - Estratégia utilizada para a identificação das células $CD14^+$ /Anexina V^+ no sangue de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos mononucleares utilizando granulocidade (SSC) *versus* tamanho (FSC). (B) Porcentagem de mononucleares que expressaram CD14 (FL3). (C) Porcentagem células $CD14^+$ positivos para Anexina (FL1) - São Paulo – 2011

No leite a análise foi similar, primeiramente foram criados portões para definir as populações de mononucleares e de granulócitos (figura 20A) e posteriormente estas células foram analisadas em gráfico de dupla marcação quanto a expressão de Anexina-V e/ou PI (figuras 20B e 20C).

Figura 20 - Estratégia utilizada para a identificação dos processos de morte das células mononucleares e granulócitos no leite de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo. (A) Identificação dos granulócitos e mononucleares utilizando granulosidade (SSC) *versus* tamanho (FSC). (B) Porcentagem de granulócitos positivos para Anexina (FL1) e PI (FL3). (C) Porcentagem células mononucleares positivos para Anexina (FL1) e PI (FL3) - São Paulo - 2011

Para a análise das células $CD14^+$ positivas para Anexina-V no leite, primeiramente realizou-se a análise das células positivas ao CD14 (figura 21A). As células $CD14^+$ foram analisadas quanto à expressão de Anexina-V (figura 21B).

Figura 21 - Estratégia utilizada para a identificação das células $CD14^+$ /Anexina V^+ no leite de caprino da raça Saanen, avaliados por citometria de fluxo (A) Porcentagem de células que expressaram CD14 (FL3). (B) Porcentagem células $CD14^+$ positivas para Anexina (FL1) - São Paulo - 2011

14.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad InStat[®], versão 3.01 para Windows 9537.

Foi verificada a normalidade da distribuição dos resultados, utilizando-se teste de Anderson-Darling.

Para a avaliação das diferenças entre as médias dos resultados obtidos, foram realizados os testes de análise de variância ANOVA One-way (Unstacked) (para dados com distribuição normal) e Mann-Whitney (para dados que não apresentaram distribuição normal). Para todos os resultados, foram consideradas significantes as análises que apresentaram $P \leq 0,05$ e foram consideradas como tendência as amostras que apresentaram o P entre 0,05 e 0,10 (PANTOJA et al., 1996).

15 RESULTADOS

15.1 MORTE CELULAR

As médias, desvios padrão, mediana e amplitude das porcentagens de células em processo de morte por apoptose (Anexina-V⁺/PI⁻), necrose (Anexina-V⁻/PI⁺) ou em apoptose e/ou necrose (Anexina-V⁺/PI⁺), além da viabilidade das células do *gate* de granulócitos do sangue não apresentaram diferença entre os grupos experimentais. Entretanto, apresentaram tendência nas porcentagens de células Anexina-V⁺/PI⁺. Esta foi maior nas células do grupo AEC+ (P=0,0723). Os dados estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16 – Porcentagens dos granulócitos que marcaram com Anexina-V e/ou PI de acordo com os grupos experimentais em sangue de caprino - São Paulo 2011

Grupo (n)		Anexina-V ⁺ /PI ⁻ (%)	Anexina-V ⁻ /PI ⁺ (%)	Anexina-V ⁺ /PI ⁺ (%)	Anexina-V ⁻ /PI ⁻ (%)
AEC- (6)	Média	4,50 ^a	4,67 ^a	0,18 ^a	90,65 ^a
	Desvio Padrão	(± 3,15)	(± 2,30)	(± 0,26)	(± 2,91)
	Mediana	4,14	4,78	0,11	90,25
	Mín-Máx	(1,04-8,42)	(1,3-8,24)	(0,0-0,7)	(86,9-94,7)
AEC+ (9)	Média	10,52 ^a	5,51 ^a	1,01 ^a	82,96 ^a
	Desvio Padrão	(± 10,75)	(± 3,07)	(± 1,18)	(± 10,64)
	Mediana	10,3	5,44	0,36	83,7
	Mín-Máx	(0,98-36,5)	(0,95-11,9)	(0,0-2,99)	(59,0-93,3)
P		0,15	0,58	0,07	0,07

AEC: Artrite Encefalite Caprina

PI: Iodeto de Propídio

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05)

As médias, desvios padrão, mediana e amplitude das porcentagens de células que morreram por apoptose (Anexina-V⁺/PI⁻), necrose (Anexina-V⁻/PI⁺) e a viabilidade das células do *gate* de mononucleares do sangue não apresentaram diferença entre os grupos experimentais. Os dados estão apresentados na tabela 17.

Tabela 17 – Porcentagens dos mononucleares que marcaram com Anexina-V e/ou PI de acordo com os grupos experimentais em sangue de caprino - São Paulo 2011

Grupo (n)		Anexina-V ⁺ /PI ⁻ (%)	Anexina-V ⁺ /PI ⁺ (%)	Anexina-V ⁺ /PI ⁺ (%)	Anexina-V ⁻ /PI ⁻ (%)
AEC- (6)	Média	5,90 ^a	8,02 ^a	0,58 ^a	85,58 ^a
	Desvio Padrão	(± 3,25)	(± 3,74)	(± 0,38)	(± 4,62)
	Mediana	4,6	7,98	0,20	88,0
	Mín-Máx	(3,16-11,4)	(1,73-13,3)	(0,0-0,64)	(78,6-89,0)
AEC+ (9)	Média	7,90 ^a	8,00 ^a	1,51 ^a	83,03 ^a
	Desvio Padrão	(± 3,87)	(± 5,01)	(± 0,92)	(± 5,45)
	Mediana	6,89	7,24	0,51	83,5
	Mín-Máx	(3,28-13,8)	(1,59-17,7)	(0,0-1,57)	(73,3-89,5)
P		0,32	0,99	0,11	0,36

AEC: Artrite Encefalite Caprina

PI: Iodeto de Propídio

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05)

As médias, desvios padrão, mediana e amplitude das porcentagens de células CD14⁺ que morreram por apoptose no sangue e no leite não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais e estão apresentadas na tabela 18.

Tabela 18 Porcentagens das células CD14⁺ que expressaram anexina-V no sangue e no leite de caprinos de acordo com os grupos experimentais - São Paulo - 2011

GRUPO		Anexina-V ⁺ (%) dos CD14 ⁺ Sangue	Anexina-V ⁺ (%) dos CD14 ⁺ Leite
AEC-	Média	24,79 ^a	53,13 ^a
	Desvio Padrão	(±16,43)	(±16,71)
	Mediana	22,20	49,95
	Mín-Máx	(4,36-53,3)	(34,50-86,50)
n		6	12
AEC+	Média	21,69 ^a	49,67 ^a
	Desvio Padrão	(±11,18)	(±12,53)
	Mediana	22,60	52,30
	Mín-Máx	(7,21-42,40)	(31,80-75,50)
n		8	14
P		0,68	0,55

AEC: Artrite Encefalite Caprina

PI: Iodeto de Propídio

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05)

As médias, desvios padrão, mediana e amplitude das porcentagens de células que morreram por apoptose (Anexina-V⁺/PI⁻), necrose (Anexina-V⁺/PI⁺) e a viabilidade (Anexina-V⁻/PI⁻), das células do *gate* de granulócitos do leite não apresentaram diferença entre os

grupos experimentais, porém apresentaram tendência nas porcentagens de células que morreram por necrose. Esta foi maior nas células do grupo AEC+ ($P=0,0739$). Os dados estão apresentados na tabela 19.

Tabela 19 - Porcentagens (médias e desvios padrões) dos granulócitos que marcaram com Anexina-V e/ou PI de acordo com os grupos experimentais em leite de caprino - São Paulo 2011

Grupo (n)		Anexina-V ⁺ /PI ⁻ (%)	Anexina-V ⁻ /PI ⁺ (%)	Anexina-V ⁺ /PI ⁺ (%)	Anexina-V ⁻ /PI ⁻ (%)
AEC- (10)	Média	24,81 ^a	1,87 ^a	5,15 ^a	68,17 ^a
	Desvio Padrão	(± 16,88)	(± 0,80)	(± 1,93)	(± 5,77)
	Mediana	25,8	1,52	5,22	66,25
	Mín-Máx	(6,71-52,5)	(1,19-3,77)	(2,11-7,79)	(39,9-90,0)
AEC+ (14)	Média	20,91 ^a	2,99 ^a	5,34 ^a	70,56 ^a
	Desvio Padrão	(± 7,40)	(± 2,01)	(± 1,18)	(± 8,12)
	Mediana	21,4	2,45	5,49	69,1
	Mín-Máx	(7,36-34,7)	(0,29-7,24)	(2,29-8,72)	(60,2-86,0)
P		0,51	0,07	0,81	0,36

AEC: Artrite Encefalite Caprina

PI: Iodeto de Propídio

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos ($P<0,05$)

As médias, desvios padrão, mediana e amplitude das porcentagens de células que morreram por apoptose, necrose ou por necrose tardia e a viabilidade das células do *gate* de mononucleares do leite não apresentaram diferença entre os grupos experimentais. Os dados estão apresentados na 20.

Tabela 20 – Porcentagens (médias e desvios padrão) das células mononucleares que marcaram com Anexina-V e/ou PI de acordo com os grupos experimentais no leite de caprino - São Paulo 2011

		Anexina-V⁺/PI⁻ (%)	Anexina-V⁻/PI⁺ (%)	Anexina-V⁺/PI⁺ (%)	Anexina-V⁻/PI⁻ (%)
AEC- (10)	Média	24.52	8.43 ^a	6.02 ^a	61,01 ^a
	Desvio Padrão	(± 10.04)	(± 8.31)	(± 6.98)	(± 20,29)
	Mediana	27,75	6,83	3,10	60,30
	Mín-Máx	(5,66-34,6)	(0,46-23,6)	(0,37-16,4)	(32,4-93,3)
AEC+ (14)	Média	29.68	6.40 ^a	6.32 ^a	57,61 ^a
	Desvio Padrão	(± 19.22)	(± 4.85)	(± 4.98)	(± 21,92)
	Mediana	27,95	5,54	5,17	53,75
	Mín-Máx	(1,24-72,8)	(0,31-15,0)	(0,08-17,9)	(19,5-98,4)
	P	0,40	0,33	0,90	0,70

AEC: Artrite Encefalite Caprina

PI: Iodeto de Propídio

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos (P<0,05)

16 DISCUSSÃO

Os processos de morte dos mononucleares e granulócitos séricos e lácteos de caprinos naturalmente infectados por VAEC, apresentaram-se harmônicos com discretas variações identificadas apenas como tendências. Estas tendências ocorreram exclusivamente nos ensaios que avaliaram os mecanismos de morte dos granulócitos, que não representam a população alvo do VAEC. Considerando-as, poder-se-ia sugerir a diminuição da viabilidade e apoptose e/ou necrose dos granulócitos sanguíneos, além do aumento da necrose dos granulócitos lácteos. Em ambas situações a população de granulócitos envolve predominantemente neutrófilos e estaria sendo alvo das influências geradas pelo vírus aos mononucleares CD14+, que não apresentaram alteração nos ensaios ora considerados.

Desconhecem-se trabalhos que tenham realizado este tipo de estudo com animais naturalmente infectados. Entretanto, estudos com infecções *in vitro* demonstraram que os lentivírus dos pequenos ruminantes induzem a apoptose das células infectadas pela via intrínseca, ou seja, estimulada pelas próprias proteínas virais (DUVAL et al., 2002; BELLET et al., 2004; REA-BOUTROIS et al., 2008; REA-BOUTROIS et al., 2009).

As células predominantemente infectadas pelo vírus são monócitos/macrófagos, que neste trabalho foram identificadas no *gate* de mononucleares. Como os monócitos representam apenas uma pequena porção das células mononucleares sanguíneas optou-se pela marcação com o anticorpo anti-CD14 no ensaio de apoptose. A viabilidade destas, tanto no sangue quanto no leite, não alterou, sugerindo que em infecções naturais o vírus não acelera a morte destas células, como descritas nas infecções *in vitro* (DUVAL et al., 2002; BELLET et al., 2004; REA-BOUTROIS et al., 2008; REA-BOUTROIS et al., 2009), ou ainda que esta poderia depender do estadiamento da infecção.

Inesperadamente, a restrição das variações aos granulócitos, mesmo sob a discreta sugestão de tendência, dos animais sororreagentes ao VAEC, mostrou um resultado interessante. Estas células não são o principal alvo de infecção viral (NARAYAN et al., 1982; RYAN et al., 2000), mas como foi discutido no capítulo dois desta dissertação, interagem com as outras células presentes na glândula mamária, inclusive com os monócitos/macrófagos infectados pelo vírus (PAAPE; CAPUCO, 1997; SORDILLO; SHAFFER-WEAVER; DeROSA, 1997).

Já na corrente sanguínea, a interação nas respostas das células que albergam o VAEC com outras células fica mais limitada, pois o vírus permanece quiescente dentro dos monócitos infectados (NARAYAN et al., 1982; PELUSO et al., 1985). Talvez isso possa explicar o porque só houve um pequeno aumento nos processos de morte por necrose e/ou apoptose dos granulócitos dos animais sororreagentes. Essa denominação é utilizada para as células que apresentaram dupla marcação por Anexina-V e PI (PIEPERS et al., 2008; BLAGITZ et al., 2011), mas não oferece um valor biológico propriamente dito. Outros autores referem essa marcação como apoptose tardia, pois afirmam que quando a célula começa o processo de apoptose, inicialmente só expõe a fosfatidilserina (4-6h), sendo marcada pela Anexina-V, mas com o tempo a membrana permite a entrada do PI, resultando na dupla marcação (DARZYNKIEWICZ et al., 1992)

A indução da apoptose de neutrófilos já foi descrita em humanos portadores do vírus da SIDA, tanto pela via intrínseca como extrínseca, levando a disfunções de neutrófilos, neutropenia e infecções secundárias (PITRAK; 1997; SALMEN et al., 2004). Apesar disto, na infecção pelo VAEC a neutropenia não é relatada, bem como a disfunção dos neutrófilos sistêmicos também não foi observada com as técnicas avaliadas no presente estudo. Porém a tendência em na diminuição da viabilidade dos granulócitos séricos observada nos animais sororreagentes deve ser valorizada.

Observou-se, no capítulo anterior, uma disfunção dos neutrófilos na fagocitose de *S. aureus*, e no presente capítulo observa-se uma tendência a um aumento da necrose destas mesmas células. Van Oostveldt et al. (2002) avaliaram o efeito da apoptose na fagocitose, explosão respiratória e expressão de receptor de adesão em bovinos, e referiram que a fagocitose pode ser modulada pelo estímulo da apoptose, mas na presença de outro estímulo predominante, pode incorrer em necrose e agudização do processo inflamatório.

Desconhece-se outros estudos que tenham avaliado a interferência do VAEC nas funções e nos processos de morte de granulócitos, e ressalta a importância desta célula nesta associação.

17 CONCLUSÕES

- A infecção pelo VAEC pode ser associada a um aumento de células CD14⁺ no leite, mas não no sangue. O vírus não pode ser considerado imunossupressor, pois não diminui a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e nem de granulócitos PG68A⁺.
- A função fagocítica e a produção de ERO não estiveram alteradas nas células CD14⁺ dos caprinos infectados pelo VAEC nem no sangue nem no leite. Dos granulócitos PG68A⁺, somente a fagocitose de *Staphylococcus aureus* esteve diminuída nas células do leite nos animais positivos ao vírus, indicando poder haver maior susceptibilidade a infecção bacteriana por patógenos específicos na glândula mamária de cabras infectadas.
- No modelo experimental empregado não foi observada repercussão significativa do VAEC sob os mecanismos de morte celular. Apesar disso ficou patente a necessidade de atenção à possibilidade dessa ocorrer em granulócitos e do emprego de avaliações de mecanismos de morte associados.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. S.; KLEVJER-ANDERSON, P.; CARLSON, J. L.; McGUIRE, T. C.; GORHAM, J. R. Transmission and control of caprine arthritis-encephalitis virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 9, p. 1670-1675, 1983.
- AL-QUDAH, K.; AL-MAJALI, A. M.; ISMAIL, Z. B. Epidemiological studies on caprine arthritis-encephalitis virus infection in Jordan. **Small Ruminant Research**, v. 66, n. 1-3, p. 181-186, 2006.
- AMARANTE-MENDES, G. P. Cell death and the well of the organism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 67, p.1565–1566, 2010.
- ANDERSON, L. W.; KLEVJER-ANDERSON, P.; LIGGITIF, H. D. Susceptibility of blood-derived monocytes and macrophages to caprine arthritis-encephalitis virus. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 2, p. 837-840, 1983.
- 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 JUNIOR, J. 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, p. 390-397, 2008.
- BAGGIOLINI, M.; LOETSCHER, P.; MOSER, M. Interleukin-8 and the chemokine family. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 103-108, 1995.
- BANDEIRA, D. A.; CASTRO, R.; AZEVEDO, E. O.; MELO, L. S. S.; MELO, C. B. Seroprevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in goats in the Cariri region, Paraíba state, Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 180, p.399-401, 2009.
- BANKS, K. L.; ADAMS, D. S.; McGUIRE, T. C.; CARLSON, J. Experimental infection of sheep by caprine arthritis-encephalitis virus and goats by progressive pneumonia virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 12, p. 2307-2311, 1983.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility tests by standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BELLET, V.; DELEBASSÉE, S.; BOSGIRAUD, C. Visna/maedi virus-induced apoptosis involves the intrinsic mitochondrial pathway. **Archives of virology**, n. 149, p. 1293-1307, 2004.

BLACKLAWS, B. A.; BERRIATUA, E.; TORSTEINSDOTTIR, S.; WATT, N. J.; ANDRES, D.; KLEIN, D.; HARKISS, G. D. Transmission of small ruminant lentiviruses. **Veterinary microbiology**, n. 101, p. 199-208, 2004.

BLAGITZ, M.G. **Avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos**. 160f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BLAGITZ, M. G.; SOUZA, F. N.; GOMES, V.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Apoptosis and necrosis of polymorphonuclear leukocytes in goat milk with high and low somatic cell count. **Small Ruminants Research**, v. 100, n. 1, p. 67 – 71, 2011.

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

BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnóstico. In: BIRGUEL, E. H.; BENESI, F. J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 249-60.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; CESTARI, V.; SAMPAIO, R. M.; LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL, D. B.; RAIMONDO, R. F. S.; BRANDESPIN, F. B.; BIRGEL, E. H. Influência da infecção pelo vírus da artrite encefalite caprina nas características físico-químicas e celulares do leite de caprinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 3, p. 199-206, 2007.

BOULAABA, A.; GRABOWSKI, N.; KLEIN, G. Differential cell count of caprine milk by flow cytometry and microscopy. **Small Ruminants Research**. n. 97, p. 117-123, 2011.

CARR, M. W.; ROTH, S. J.; LUTHER, E.; ROSE, S. S.; SPRINGER, T. A. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 3652-3656, 1994.

CHEEVERS, W. P.; KNOWLES, D. P. J.; NORTON, L. K., Neutralization resistant antigenic variants of caprine arthritis-encephalitis lentivirus associated with progressive arthritis. **J. Infect. Dis.** n.164, p.679–685, 1991.

CHEEVERS, W. P.; MCGUIRE, T. C.; NORTON, L. K.; CORDERY-COTTER, R.; KNOWLES, D. P., Failure of neutralizing antibody to regulate CAE lentivirus expression *in vivo*. **Virology**. n. 196, p. 835-839, 1993.

CLEMENTS, J. E.; GDOVIN, S. L.; MONTELARO, R. C.; NARAYAN, O, Antigenic variation in lentiviral diseases. **Annual Review of Immunology**, n. 6, p.139–159, 1988.

CLEMENTS, J.; ZINK, M. C. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 1, , p. 100–117, 1996.

COLEMAN, C. M.; WU, L. HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. **Retrovirology**, v. 6, n. 51, 2009. Disponível em: <<http://www.retrovirology.com/content/6/1/51>>. Acesso em: 23/05/2012 às 10:30h.

CONTRERAS, A.; SIERRA, D.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; MARCO, J. C.; PAAPE, M. J.; GONZALO, C. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, p. 145-153, 2007.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S.; SANDE, R. D.; GORHAM, J. R.; HENSON, J. B. . The connective tissue component of the caprine arthritis-encephalitis syndrome. **American Journal of Pathology**, n. 100, p. 443–454, 1980.

CRAWFORD, T. B.; ADAMS, D. S. Caprine arthritis-encephalitis: clinical features and presence of antibody in selected goat populations. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 178, n.7, p. 713-719, 1981.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, n. 232, p. 3-14, 1999.

DAWSON, M. Maedi/Visna: a review. **Veterinary Records**, n. 106, p. 212-216, 1980.

DUVAL, R.; DELEBASSE, S.; CARDOT, P. J. P.; BOSGIRAUD, D. Visna virus-induced cytopathic effect in vitro is caused by apoptosis. **Archives of Virology**, n. 147, p. 943-959, 2002.

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; DAHLBERG, J. E.; THEILEN, G. H.; PEDERSEN, N. C. Modes of transmission of caprine arthritis-encephalitis virus infection. **Small Ruminant Research**, n. 10, p. 251-262, 1993

EAST, N. E.; ROWE, J. D.; MADEWELL, B. R.; FLOYD, K. Serological prevalence of caprine arthritis-encephalitis virus in California goat dairies. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 190, n. 2, p. 182-186, 1987.

ELBIM, C.; PREVOT, M. H.; BOUSCARAT, F.; FRANZINI, E.; CHOLLET-MARTIN, S.; HAKIM, J.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Polymorphonuclear neutrophils from human immunodeficiency virus-infected patients show enhanced activation, diminished fmlp-induced l-selectin shedding, and an impaired oxidative burst after cytokine priming. **Blood**, v. 84, n. 8, 1994.

GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; MOLINEAUX, S.; CLEMENTS, J. E.; GHOTBI, Z. Slow, persistent replication of lentiviruses: Role of tissue macrophages and macrophage precursors in bone marrow. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 7086-7090, 1985.

GENDELMAN, H. E.; NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; KENNEDY, P. G. E.; GHOTBI, Z.; CLEMENTS, J. E.; STANLEY, J.; PEZESHKPOUR, G. Tropismo of sheep lentiviruses for monocytes: susceptibility to infection and virus gene expression increase

during maturation of monocyte to macrophages. **Journal of Virology**, v. 58, n.1, p. 67-74, 1986.

GEORGE, J. W.; PEDERSEN, N. C.; HIGGINS, J. The effect of age on the course of experimental feline immunodeficiency virus infection in cats. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 9, n. 9, 1993.

GEORGSSON, G.; PALSSON, P. A. The histopathology of maedi, a slow viral pneumonia of sheep. **Veterinary Pathology**, n.8, p. 63–80, 1971.

GOETSCH, A. L.; ZENG, S. S.; GIPSON, T. A. Factors affecting goat milk production and quality. *Small ruminant research*, v. 101, p. 55-63, 2011.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v.32, n.1, p. 37-43; 2006.

GOMES, V.; MADUREIRA, K. M.; BARCELOS, B.; SILVA, C. P. C.; BLAGITZ, M. G.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Composição celular e bromatológica do leite de cabras infectadas pelo vírus da Artrite Encefalite Caprina (VAEC). **Veterinária e Zootecnia**, n. 18, v. 4, p. 1053-1055, 2011. Suplemento 3.

GORREL, M. D.; MALCOLM, R. B.; SHEFFER, D.; ADAMS, R. J.; NARAYAN, O. Ovine lentivirus is macrophagetropic and does not replicate productively in T lymphocytes. **Journal of Virology**, v. 66, n. 5, p. 2679-2688, 1992.

GREZEL, D.; FORESTIER, J.; GUIGUEN, F.; MORNEX, J. F. T-lymphocyte populations in the blood of caprine arthritis encephalitis virus-infected goats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 57 p. 99-104, 1997.

GUIGUEN F.; GREENLAND, T.; PARDO, E.; PANAYE, G.; MORNEX, J. E. F. S. Flow cytometric analysis of goat milk lymphocytes: subpopulations and adhesion molecule expression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v 53, p 173-178, 1996.

HAASE, A. Pathogenesis of lentivirus infections. **Nature**, v. 322, n. 10, p. 130-136. 1986.

HAEINLEIN, G. F. W. About the evolution of goat and sheep milk production. **Small Ruminant Research**, v. 68 p. 3–6, 2007.

HANON, E.; HOORNEAERT, S.; DEQUIEDT, F.; VANDERPLASSCHEN, A.; LYAKU, J.; WILLEMS, L.; PASTORET, P. P.; Bovine herpesvirus 1 – induced apoptosis occurs at the G0/G1 phase of the cell cycle. *Virology*, v. 232, n. 2, p. 351-358, 1998.

HASEGAWA, M. Y. Estudo comparativo entre as formas clínicas e relação com as variantes do vírus da Artrite-Encefalite caprina isolados no Estado de São Paulo. , 2010, (77f.)
Dissertação (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

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.

ICTV. Virus Taxonomy: 2009 Release. **Internacional Comittee on Taxonomy of Viruses – Virology division – IUMS**. Disponível em:

<<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>> Acesso em: 10/02/2012.

JOLLY, P. E.; GANGOPADHYAY, A.; CHEN, S.; REDDY, P. R.; WEISS, H. L.; SAPP, W. J. Changes in the leukocyte phenotype profile of goats infected with the caprine arthritis encephalitis virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, p. 97-106, 1997.

KABA, J.; STRZALKOWSKA, N.; JOZWIK, A.; KRYZEWSKI, J.; BAGNICKA, E. Twelve-year cohort study on the influence of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk yield and composition. **Jornal Dairy Science**, n. 95, p. 1617-1622, 2012.

KABA, J.; WINNICKA, A.; ZALESKA, M.; NOWICKI, M.; BAGNICKA, E. Influence of chronic caprine arthritis-encephalitis virus infection on the population of peripheral blood leukocytes. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 14, n. 4, p. 585-590, 2011.

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

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

KARR, B. M.; CHEBLOUNE, Y.; LEUNG, K.; NARAYAN, O. Genetic characterization of two phenotypically distinct north american ovine lentiviruses and their possible origin from caprine arthritis-encephalitis virus. **Virology**, v. 225, p. 1-10, 1996.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, n. 26, p. 239 – 257, 1972.

KOESS, C.; HAMANN, J. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 2, p. 225-232, 2008.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUNEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

KRYSKO, D. V.; BERGHE, T. V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, n. 44, p. 205–221, 2008.

LANDMANN, R.; MULLER, B.; ZIMMERLI, W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes and infection*, v. 2, n. 3, p. 295-304, 2000.

LARA, M. C. C. S. H.; BIRGEL JUNIOR, E. H.; GREGORY, L.; BIRGEL, E. H. Aspectos clínicos da artrite-encefalite dos caprinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 736-740, 2005.

LECHAT, E.; MILHAU, N.; BRUN, P.; BELLATON, C.; GREENLAND, T.; MORNEX, J. F.; LE JAN, C. Goat endothelial cells may be infected in vitro by transmigration of caprine arthritis-encephalitis virus-infected leucocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, n. 3-4, p. 257 263, 2005.

LECHNER, F.; MACHADO, J.; BERTOLONI, G.; SEOW, H. F.; DOBBELAERE, D. A. E.; PETERHANS, E. Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. **Journal of Virology**, n. 10, v. 71, p. 7488–7497, 1997.

LEGASTELOIS, I.; CORDIER, G.; COZON, G.; CADORE, J. L.; GUIGUEN, F.; GREENLAND, T.; MORNEX, J. F. Visna-maedi virus-induced expression of interleukin-8 gene in sheep alveolar cells following experimental in vitro and in vivo infection. **Research Virology**, n. 47, p.191–197, 1996.

LEITE, B. L. S.; MODOLO, J. R.; PADOVANI, C. R.; STACHISSINI, A. V. M.; CASTRO, R. S.; SIMÕES, L. B. Avaliação da taxa de ocorrência da artrite-encefalite caprina a vírus pelas regionais do escritório de defesa agropecuária da estado de São Paulo, Brasil, e seu mapeamento por meio de sistemas de informações geográficas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 1, p. 21-26, 2004.

LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKOVE, N. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. **Journal Dairy Science**, n. 87, p. 1719-1726, 2004.

LEITNER, G.; KRIFUCKS, O.; WEISBLIT, L.; LAVI, Y.; BERNSTEIN, S.; MERIN, U. The effect of caprine arthritis encephalitis virus infection on production in goats. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 3, p.328-331, 2010.

LEITNER, G.; SAPEIRO, S.; KRIFUCKS, O.; WEISBLIT, L.; LAVI, Y.; HELLER, E. D. Systemic and local mammary gland immunity to udder infection in goats by various *Staphylococcus* species. **Small Ruminant Research**, v. 95, n.2-3, p. 160-167. 2011.

LERONDELLE, C.; RICHARD, Y.; ISSARTIAL, J. Factors affecting somatic cell count in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 8, p. 129-139, 1992.

LEROUX, C.; CHASTANG, J.; GREENLAND, T.; MORNEX, J. F. Genomic heterogeneity of small ruminant lentiviruses: existence of heterogeneous populations in sheep and of the

same lentiviral genotypes in sheep and goats. **Archives of Virology**, v. 142, p. 1125-1137, 1997.

LEVY, J.A. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. **Microbiological Reviews**, v. 57, n. 1, p. 183-289, 1993.

LUENGO, C.; SANCHEZ, A.; CORRALES, J. C.; FERNANDEZ, C.; CONTRERAS, A. Influence of intramammary infection and non-infection factors on somatic cell counts in dairy goats. **Journal of Dairy Research**, n. 71, p. 169-174, 2004.

LUJAN, L.; MARTIN, J. F. G.; DE LUCO, D. F.; VARGAS, A; BADIOLA, J. J. Pathological changes in the lungs and mammary glands of sheep and their relationship with maedi-visna infection. **Veterinary Record**, n. 129, p. 51-54, 1991.

MATSUMOTO, T.; MIIKE, T.; NELSON, R. P.; TRUDEAU, W. L.; LOCKEY, R. F.; YODOI, J. Elevated serum levels of IL-8 in patients with HIV infection. **Clinical Experimental Immunology**, n. 93, p.149-151, 1993.

McGUIRE, T. C.; NORTON, L. K.; O'ROURKE, L.; CHEEVERS, W. P. Antigenic variation of neutralization-sensitive epitopes of caprine arthritis-encephalitis lentivirus during persistent arthritis. *Journal of Virology*, v. 62, n. 9, p. 3488-3492, 1988.

MCMICHAEL, A. J.; ROWLAND-JONES, S. L. Cellular immune responses to HIV. **Nature**, v. 410, n. 6831, p. 980-987, 2001.

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

MILHAU, N.; RENSON, P.; DREESEN, I.; GREENLAND, T.; BELLATON, C.; GUIGUEN, F.; MORNEX, J. F.; LE JAN, C. Viral expression and leukocyte adhesion after in vitro infection of goat mammary gland cells with caprine arthritis-encephalitis virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, p. 93-99. 2005.

MONDAL, B.; SREENIVASA, B. P.; DHAR, P.; SINGH, R. P.; BANDYOPADHYAY, S. K. Apoptosis induced by peste des *petits ruminants virus* in goat peripheral blood mononuclear cells. **Virus Research**, n. 73, p. 113-119, 2001.

MOURA SOBRINHO, P.A.; RAMOS, T.R.R.; FERNANDES, C.H.C.; CAMPOS, A.C.; COSTA, L.M.; CASTRO, R.S. Prevalência e fatores associados à infecção por lentivírus de pequenos ruminantes em caprinos no estado do Tocantins. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 117-124, 2010.

MSELLI-LAKHAL, L.; GUINGUEN, F.; FORNAZERO, C.; DU, J.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BELLEYDIER, S.; MORNEX, J. F.; CHEBLOUNE, Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection *in vitro*. **Virology**, v. 259, p. 67-73, 1999.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J.; STRANDBERG, J. D.; CORK, L. C.; GRIFFIN, D. E. Biological characterization of the virus causing leukoencephalitis and arthritis in goats. **Journal of General Virology**, n. 50, p. 69-79, 1980.

NARAYAN, O.; WOLINSKY, J. S.; CLEMENTS, J. E.; STRANDBERG, J. D.; GRIFFIN, D. E.; CORK, L. C. Slow virus replication: the role of macrophages in the persistence and expression of visna viruses of sheep and goats. **Journal of General Virology**, v. 59, p. 345-356, 1982.

NARAYAN, O.; KENNEDY-STOSKOPF, S.; SHEFFER, D.; GRIFFIN, D. E.; CLEMENTS, J. E. Activation of caprine arthritis-encephalitis virus expression during maturation of monocytes to macrophages. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 1, p. 67-73, 1983.

NARAYAN, O.; CORK, L. C. Lentiviral diseases of sheep and goats: chronic pneumonia, leukoencephalomyelitis and arthritis. **Review of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 89-98, 1985.

NARAYAN, O.; CLEMENTS, J. E. Biology and pathogenesis of lentiviruses. **Journal of General Virology**, n. 70, p. 1617-1639, 1989.

NMC - Nacional Mastitis Concil, Microbiological Procedures for the Diagnosis of Bovine Udder Infection and Determination of Milk Quality. **NMC, 2004**. Disponível em <<http://www.nmconline.org/sampling.htm>>. Acesso em: 08/03/2012.

NORD, K.; ÅDNØY, T. Effects of infection by caprine arthritis-encephalitis virus on milk production goats. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 2391-2397, 1997.

OIE. Caprine arthritis encephalitis & maedi visna. In: **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. p. 983-991. Disponível em <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.03-04_CAE_MV.pdf>. Acesso em: 22/06/2012.

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

PAGNINI, U.; MONTAGNARO, S.; SANFELICE DI MONTEFORTE, E.; PACELLI, F.; DE MARTINO, L.; ROPERTO, S.; FLORIO, S.; IOVANE, G. Caprine herpesvirus-1 (CapHV-1) induces apoptosis in goat peripheral blood mononuclear cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, p. 283-293, 2005.

PALLELA JR, F. J.; DELANEY, K. M.; MOORMAN, A. C.; LOVELESS, M. O.; FUHRER, J.; SATTEN, G. A.; ASCHMAN, D. J.; HOLMBERG, S. D. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 13, p. 853-860, 1998.

PANTOJA, J.; FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L.; HULL, B. L. Fatty acid digestion in lactating dairy cows fed fats varying in degree of saturation and different fiber sources. **Journal Dairy Science**, v. 79, p. 575-584, 1996.

PATEL, J. R.; HELDENS, J. G. M.; BAKONI, T.; RUSVAI, M. Important mammalian veterinary viral immunodiseases and their control. **Vaccine**, v. 30, p. 1767-1782, 2012.

PELUSO, R.; HAASE, A.; STOWRING, L.; EDWARDS, M.; VENTURA, P. A Trojan horse mechanism for the spread of visna virus in monocytes. **Virology**, v. 147, n. 1, p. 231-236, 1985.

PERSSON-WALLER, K.; COLDITZ, I. G.; SEOW, H. F. Accumulation of leucocytes and cytokines in the lactating ovine udder during mastitis due to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Research in Veterinary Science**, n. 62, p. 63-66, 1997.

PESSOA, R. B.; BLAGITZ, M. G.; BATISTA, C. F.; SANTOS, B. P.; PARRA, A. C.; SOPUZA, F. N.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Avaliação da apoptose de leucócitos polimorfonucleares CH138+ em leite bovino de alta e baixa contagem de células somáticas – dados preliminares. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 3, p. 533-539, 2012.

PETERHANS, E.; GREENLAND, T.; BADIOLA, J.; HARKISS, G.; BERTONI, G.; AMORENA, B.; ELIASZEWICZ, M.; JUSTE, R.A.; KRAßNIG, R.; LAFONT, J.P.; LENIHAN, P.; PÉTURSSON, G.; PRITCHARD, G.; THORLEY, J.; VITU, C.; MORNEX, J. F.; PÉPIN, M. Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes. **Veterinary Research**, v. 35, p. 257-274, 2004.

PINHEIRO, R. R.; GOUVEIA, A. M. G.; ALVES, F. S. F.; HADDAD, J. P. A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 5, p. 534-543, 2000.

PITRAK, D. L.; TSAI, H. C.; MULLANE, K. M.; SUTTON, S. H.; STEVENS, P. Accelerated neutrophil apoptosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 12, p. 2714-2719, 1996.

PITRAK, D. L. Apoptosis and its role in neutrophil dysfunction in AIDS. **The Oncologist**, v. 2, p. 121-124, 1997.

POLLARI, F. L.; WANGSUPHACHART, V. L.; DIGIACOMO, R. F.; EVERMANN, J. F. Effects of bovine leukemia virus infection on production and reproduction in dairy cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 56, p. 289-295, 1992.

PONTI, W.; PAAPE, M.; BRONZO, V.; PISONI, G.; POLLERA, C.; MORONI, P. Phenotypic alteration of blood and milk leukocytes in goats naturally infected with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). **Small Ruminants Research**, v. 78, p. 176-180, 2008.

PRESCOTT, S. C.; BREED, R. S.; The determination of the number of the body cells in milk by a direct method. *Jornal of infection disease*. v. 7, p. 632-640, 1910.

PUGH D.G. Conversões e valores normais. In: **Clínica de ovinos e caprinos**, 2005. 513 p.

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, 2005.

REA-BOUTROIS, A.; PONTINI, G.; GREENLAND, T.; MEHLEN, P.; CHEBLOUNE, Y; VERDIER, G.; LEGRAS-LACHUER, G. Caprine arthritis-encephalitis virus induces apoptosis in infecter cells *in vitro* through the intrinsic pathway. **Virology**, n. 375, p. 452-463, 2008

REA-BOUTROIS, A.; VILLET, S.; GREENLAND, T.; MEHLEN, P.; CHEBLOUNE, Y.; VERDIER, G.; LEGRAS-LACHUER, G. Small ruminant lentivirus Tat protein induces apoptosis in caprine cells *in vitro* by the intrinsic pathway. **Virology**, v. 383, n. 1, p. 93-102, 2009.

REINA, R.; BERRIATUA, E.; LUJAN, L.; JUSTE, R.; SANCHEZ, A.; ANDRES, D.; AMORENA, B. Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. **The Veterinary Journal**, n. 182, p. 31 – 37, 2009.

ROILIDES, E.; MERTINS, S.; EDDY, J.; WALSH, T. J.; PIZZO, P.A; RUBIN, M. Impairment of neutrophil chemotactic and bactericidal function in children infected with human immunodeficiency virus type 1 and partial reversal after *in vitro* exposure to granulocytemacrophage colony-stimulating factor. **The Journal of Pediatrics**, n. 517, p. 531-540, 1990.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

RYAN, D. P.; GREENWOOD, P. L.; NICHOLLS, P. J. Effect of caprine arthritis-encephalitis virus infection on milk cell count and N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in dairy goats. **Journal Dairy Research**, n. 60, v. 3, p. 299-306, 1993.

RYAN, S.; TILEY, L.; McCONNEL, I.; BLACKLAWS, B. Infection of Dendritic Cells by the maedi-visna lentivirus. **Journal of Virology**, v. 74, n. 21, 2000.

SALMEN, S.; TERÁN, G.; BORGES, L. ; GONCALVES, L.;ALBARRÁN, B.; URDANETA, H.; MONTES, H.; BERRUETA, L. Increased Fas-mediated apoptosis in polymorphonuclear cells from HIV-infected patients. **Clinical Experimental Immunology**, v. 137, p. 166–172, 2004.

SANCHEZ, A.; CONTRERAS, A.; CORRELES, J. C.; MARCO, J. C. Relationships between infection with caprine arthritis encephalitis virus, intramammary bacterial infection and somatic cell counts in dairy goats. **Veterinary Records**. n. 148, p. 711-714, 2001.

SANCHES, B. G. S. Avaliação da função fagocítica de células da linhagem monócitos-macrófagos de caprinos naturalmente infectados pelo vírus da artrite-encefalite caprina à *Corynebacterium pseudotuberculosis*, 2008, (78f.) **Dissertação** (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

SANTIN, A. P. I.; BRITO, W. M. E. D.; REISCHAK, D.; BRITO, L. A. B. Artrite encefalite caprina: Identificação de animais soropositivos no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v.3, p.67-71, 2002.

SANTOS, B. P.; MAGALHÃES, D. L.; SILVEIRA, D.; LIMA, M. G. B.; BATISTA, C.; BLAGITZ, M. G.; STRICAGNOLO, C. R.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Influência do vírus da artrite encefalite dos caprinos na sanidade da glândula mamária – resultados parciais. **Veterinária e Zootecnia**, n. 18, v. 4, p. 1117-1020, 2011. Suplemento 3.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 130, n. 5, p. 199-207, 1957.

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annual Review of Immunology**, n. 23, p. 197–223, 2005.

SLÁDEK, Z.; RYŠÁNEK, D.; FALDYNA, M. Activation of phagocytes during initiation and resolution of mammary gland injury induced by lipopolysaccharide in heifers. **Veterinary Research**, n. 33, p. 191–204, 2002.

SMITS, E.; BURVENICH, C.; HEYNEMAN, R. Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 3-4, p. 259-69, 1997.

SMITH, M. C.; CUTLIP, R. Effects of infection with caprine arthritis-encephalitis virus on milk production in goats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 193, n. 1, p. 63-67. 1988.

SIGURSDSSON, B.; THORMAR, H.; PÁLSSON, P. A. Cultivation of visna virus in tissue culture. **Arch Ges Virusforsch.**, v. 10, p. 368-381, 1960.

SIGURDARDÓTTIR, B.; THOMAR, H. Isolation of a viral agent from the lungs of a sheep affected with maedi. **Journal of Infectious Diseases.**, v. 114, p. 55-60, 1964.

SILANIKOVE, N. The physiological basis of adaptation in goats to harsh environments. **Small Ruminants Research**, n. 35, p. 181-193, 2000.

SILANIKOVE, N.; LEITNER, G.; MERIN, U.; PROSSER, C. G. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Research**, n. 89, p. 110-124, 2010.

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

SOUZA, F. N.; LATORRE, A. O.; CANICEIRO, B. D.; SAKAI, M.; KIELING, K.; BLAGITZ, M. G.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Proliferação de linfócitos e apoptose de células CD5+ de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina. **Arquivos brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1124-1130, 2011.

STÜNZI, H.; BÜCH, H. F.; LE ROY, H. L.; LEEMAN, W. Endemische arthritis chronica bei Ziege. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 106, p. 778-788, 1964.

THORMAR, H. A comparison of visna and maedi viruses I. Physical chemical and biological properties. **Research in Veterinary Sciences**, v. 6, p. 117-128, 1965.

THORMAR, H.; HELGADOTTIR, H. A comparison of visna and maedi viruses. II. Serological relationships. **Research in Veterinary Sciences**, v. 6, p. 456-465, 1965.

TURIN, L.; PISONI, G.; GIANNINO, M. L.; ANTONINI, M.; ROSATI, S.; RUFFO, G.; MORONI, P. Correlation between parameters in CAEV seropositive and negative primiparous goats during an eradication program in Italian farm. **Small Ruminants Research**, v. 57, p. 73-79, 2005.

VAN OOSTVELDT, K.; PAAPE, M. J.; DOSOGNE, H.; BURVENICH, C. Effect of apoptosis on phagocytosis, respiratory burst and CD18 adhesion receptor expression of bovine neutrophils. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, p. 37-50, 2002.

WERLING, D.; LANHGHANS, W.; GEARY, N. Caprine arthritis encephalitis virus infection changes caprine blood monocytes responsiveness to lipopolyssaccharide stimulation in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n. 43, p. 401-411, 1994.

WHYTE, M. K. B.; MEAGHER, L. C.; MACDERMOT, J.; HASLETT, C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 150, p. 5124-5134, 1993.

WILKERSON, M. J.; DAVIS, W. C.; BASZLER, T. V.; CHEEVERS, W. R., Immunopathology of chronic lentivirus-induced arthritis. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 6, p. 1433-1443, 1995.

WINNIKA, A.; KLUCINSKI, W.; HOSER, G.; SIKORA, J.; KAWIAK, J. Flow cytometry analysis of milk and peripheral blood cells from goats during lactation. **Journal Veterinary Medicine**, n. 46, p. 459-464, 1999.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p. 167-190, 1995.

ZHANG, G.; ALDRIDGE, S.; CLARKE, M. C.; McCAULEY, J. W. Cell death induced by cytopathic bovine viral diarrhea virus is mediated by apoptosis. **Journal of General Virology**, n. 77, p. 1677-1681, 1996.

ZINK, M. K.; YAGER, J. A.; MYERS, J. D. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus. *American Journal of pathology*, v. 136, n. 4, p. 843-854, 1990.