GIANCARLO BONAGURA

Avaliação das concentrações séricas e lácteas de citocinas em vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos

São Paulo

2012

GIANCARLO BONAGURA

Avaliação das concentrações séricas e lácteas de citocinas em vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos

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.

VERSÃO CORRIGIDA

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientadora:
Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera

De acordo:_____

Orientador (a)

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.2641
FMVZ

Bonagura, Giancarlo
Avaliação das concentrações séricas e lácteas de citocinas em vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos / Giancarlo Bonagura. -- 2012.
146 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. Bovinos. 2. Citocinas. 3. Glândula mamária. 4. Leucose enzoótica dos bovinos. 5. Imunologia. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação das concentrações séricas e lácteas de citocinas em vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos", protocolado sob o nº 1685/2009, utilizando 100 (cem) bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 1º/7/2009.

We certify that the Research "Evaluation of serum and milk concentrations of cytokines in cows naturally infected by bovine leucosis virus", protocol number 1685/2009, utilizing 100 (one hundred) cows, under the responsibility Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 7/1st/2009.

São Paulo, 15 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

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

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BONAGURA, Giancarlo

Título: Avaliação das concentrações séricas e lácteas de citocinas em vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos

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(a).Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

À minha família, fonte de inspiração e amor para este e todos os outros sonhos e desafios de minha vida.

À minha mãe, Sandra de Marco Bonagura (*in memorian*).

Lembro-me que embarcamos juntos neste sonho, hoje ao completá-lo

te sinto tão próxima de mim quanto sempre esteve...

Não existe nada que eu conheça que possa expressar meu amor e

minha gratidão...

por tudo...

sempre!

AGRADECIMENTOS

À minha amiga e orientadora, Prof.ª Dr.ª Alice Maria Melville Paiva Della Libera, pela gentil acolhida e por toda a paciência e cumplicidade durante os momentos difíceis que vive ao longo desta empreitada. Seu carinho... seus conselhos... ah... os famigerados “desafios da vida adulta”... a palavra “orientadora” nunca fez tanto sentido para mim. Muitíssimo obrigado!

Ao meu pai Luiz pelo carinho, incentivo e suporte. Sou e serei eternamente grato por seu empenho em construir em cada um nós mais do que bons profissionais, bons seres humanos. Obrigado, amo você!

À minha companheira Kini por todo amor, carinho e por tantas e tantas vezes fazer de meus objetivos nossos sonhos. Te amo e obrigado!

Ao meu irmão Jordan, e sua pequena família, por tudo que temos e que é muito especial. Pelas boas conversas, pela cumplicidade e compartilhamento. Valeu maninho! Valeu Claudinha! Amo vocês!

Ao meu irmão Marcio cuja coragem e determinação sempre foram motivo de orgulho para mim. Posso dizer a você e a minha amada sobrinha Keke que nosso convívio nos últimos tempos tem feito de mim e de minha vida algo muito melhor. Obrigado! Amo vocês!

A toda minha família, fonte de alegria e força para continuar a caminhar sempre.

A família Mendes Ramos Nunes de Campos pelo carinho e apoio ao longo de todos estes anos.

Aos amigos médicos veterinários pós-graduandos Andrea Cristina Parra, Bruna Parapinski dos Santos, Camila Freitas Batista, Heloisa Godoi Bertagnon e Maria Gabriela Barbosa Lima. Este estudo é o resultado do carinho e da dedicação de todos nós. Muito obrigado pelo empenho de todas vocês.

À Prof.ª Dr.ª Maiara Garcia Blagitz, da Universidade Federal do Paraná, por todo empenho e pela constante troca de informações e experiências. Sem seu trabalho a realização deste estudo não seria possível. Muito obrigado!

Ao amigo médico veterinário pós-graduando Fernando Nogueira de Souza, pela troca de conhecimento durante a realização deste estudo. Obrigado!

À amiga médica veterinária pós-graduanda Camila Michele Appolinário pelo carinho, apoio e suporte ao longo desta etapa. Obrigado!

As amigas médicas veterinárias Rita de Cassia Henriques Dantas e Cristiane de Almeida Neves, pela ajuda, carinho e compartilhamento ao longo de todos estes anos. Muito obrigado!

À Cláudia Regina Stricagnolo, técnica do Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, que participou ativamente na realização deste estudo. Meus mais sinceros agradecimentos.

À Drª Gerlândia Neres Pontes, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela atenção e orientações durante a execução deste estudo. Obrigado!

Aos professores do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo: Archivaldo Reche Junior, Carla Bargi Belli, Carlos Eduardo Larsson, Denise Saretta Schwartz, Enrico Lippi Ortolani, Fábio Celidônio Pogliani, Fernando José Benesi, Lilian Gregory, Marcia Mery Kogika, Maria Helena Matiko Akao Larsson, Maria Claudia Araripe Sucupira, Mitika Kurubayashi Hagiwara, Raquel Yvonne Arantes Bacarin, Silvia Regina Ricci Lucas, Viviani Gomes e Wilson Roberto Fernandes. Agradeço pelos ensinamentos e agradável convivência ao longo deste período.

Aos demais pós-graduandos do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela constante troca de conhecimento e agradável convivência.

Aos funcionários da biblioteca “Virginie Buff D’Ápice”. Sempre muito dispostos a ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo apoio e convivência.

Enfim a todos e a tudo que de alguma forma possam ter colaborado e participado desta conquista, os meus mais sinceros agradecimentos... de coração!!!

Live as if you were to die tomorrow.

Learn as if you were to live forever.

Mahatma Gandhi

RESUMO

BONAGURA, G. **Avaliação das concentrações séricas e lácteas de citocinas em vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos.** [Evaluation of serum and whey concentrations of cytokines in cows naturally infected by bovine leukosis virus]. 2012. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Dentre os vários fatores que podem influenciar a polarização das respostas imunológicas nos animais destacam-se o tipo do agente agressor envolvido, as células apresentadoras de antígenos atuantes no processo e o microambiente formado pelas citocinas. Diferentes perfis de citocinas podem determinar o curso da doença, uma vez que distúrbios no equilíbrio da produção e liberação destes polipeptídeos têm papel significativo no desencadeamento e agravamento de diversas enfermidades. Vírus podem interferir com as funções das citocinas em vários níveis, influenciando na natureza da resposta imune do hospedeiro. Este desequilíbrio entre a produção de citocinas do tipo Th1 e Th2 é geralmente considerado como uma das causas da cronificação das infecções por retrovírus. O VLB, assim como outros retrovírus, também possui esta capacidade de manipular a resposta imune do hospedeiro a fim de direcionar os estágios alinfocitóticos (AL) e de linfocitose persistente (LP). No entanto, seu efeito diretamente sobre as citocinas no sangue e leite dos animais infectados ainda não foi completamente elucidado. Desta forma, o presente estudo objetivou a avaliação da resposta imune contra o VLB em vacas naturalmente infectadas por meio da quantificação de um perfil abrangente de citocinas presentes tanto no soro sanguíneo como no lácteo minimizados outros aspectos de estimulação que não fossem a presença do próprio vírus *in vivo*. Para tanto foram coletadas amostras de sangue e leite de 11 animais divididos em seus respectivos grupos experimentais (4, 3 e 4 animais para os grupos negativo, AL e LP, respectivamente) e determinadas as concentrações séricas e lácteas de IL-1β, IL-4, IL-10, TNF-α e IFN-γ. Para as comparações entre os grupos utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e quando estes apresentaram-se significativos aplicou-se “pós-teste” para verificar onde tal diferença ocorreu. O nível de significância aplicado nos testes foi de 5 % ($P \leq 0,05$), sempre considerando

hipóteses alternativas bicaudais. Verificou-se que não houve diferença nas concentrações das citocinas IL-1β, IL-4, IFN-γ e TNF-α no sangue dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. Quanto às concentrações das citocinas no soro lácteo dos bovinos testados nos diferentes grupos, os resultados demonstraram comportamentos semelhantes aos habitualmente descritos na literatura científica para o sangue periférico, sugerindo que a atuação do VLB sobre a glândula mamária promova interações análogas às observadas sistemicamente. Os resultados obtidos apontam para um envolvimento do VLB sobre o perfil de citocinas da glândula mamária nos animais sororreagentes.

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

ABSTRACT

BONAGURA, G. **Evaluation of serum and whey concentrations of cytokines in cows naturally infected by bovine leukosis virus**. [Avaliação das concentrações séricas e lácteas de citocinas em vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos]. 2012. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Among the many factors that can influence the polarization of immune responses in animals include the type of the offending agent involved, the antigen-presenting cells active in the process and the microenvironment formed by the cytokine. Different profiles of cytokines may determine the course of the disease, since disturbances in the balance of production and release of these polypeptides play a significant role in triggering and worsening of many diseases. Viruses can interfere with the functions of cytokines at various levels, influencing the nature of the host immune response. This imbalance in cytokine production from Th1 and Th2 is generally regarded as a cause of chronic infections by retroviruses. The BLV, like other retroviruses, also possess this ability to manipulate the host immune response in order to drive the stages non-lymphocytotic and persistent lymphocytosis. However, its effect directly on cytokines in blood and milk of infected animals has not been fully elucidated. Thus, this study aimed at evaluating the immune response against the BLV in cows naturally infected by quantifying a comprehensive profile of cytokines present in both the serum and in whey minimized others aspects of stimulation that was not the presence of the virus itself *in vivo*. For this purpose, samples of blood and milk of 11 animals divided into their respective experimental groups (4, 3 and 4 animals for groups negative, PL- and PL+, respectively) and certain whey and serum concentrations of IL-1β, IL- 4, IL-10, TNF-α and IFN-γ. For comparisons between groups used the nonparametric Kruskal-Wallis test and when they showed up was applied to significant "post test" to see where this difference occurred. The level of significance in the tests was 5 % ($P \leq 0.05$), when considering two-tailed alternative hypotheses. There was no difference in the concentrations of IL-1β, IL-4, IFN-γ and TNF-α in the blood of animals belonging to the different experimental groups. The concentrations of cytokines in the whey of cattle in different groups, the results

showed behaviors similar to those usually described in scientific literature to the peripheral blood, suggesting that the action of BLV on the mammary gland promotes interactions similar to those seen systemically. The results indicate an involvement of BLV on the cytokine profile of the mammary gland in animals seropositive.

Keywords: Cattle. Cytokines. Mammary gland. Enzootic bovine leukosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores do leucograma de bovinos sadios, em número absoluto e contagem diferencial relativa, utilizados como referência neste estudo – São Paulo – 2012 65

Tabela 2 – Valores das médias, medianas, desvios-padrões, mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e linfócitos das amostras de sangue dos animais triados durante o estudo – São Paulo – 2012 75

Tabela 3 – Valores das médias, medianas, desvios-padrão, mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e linfócitos das amostras de sangue das vacas utilizadas no experimento – São Paulo – 2012 78

Tabela 4 – Resultados médios, medianos, desvios-padrão, mínimo e máximo (CCS/mL) das quantidades de células somáticas verificadas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2012 80

Tabela 5 – Resultados médios, mediana, desvio-padrão, mínimo, máximo (pg/mL) e valor de P das quantidades séricas de IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ verificadas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2012..... 81

Tabela 6 – Resultados médios, mediana, desvio-padrão, mínimo, máximo (pg/mL) e valor de P das quantidades lácteas de IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ verificadas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2012..... 83

Tabela 7 – Comparação múltipla para IL-1β mensuradas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função dos grupos experimentais – São Paulo – 2012..... 86

Tabela 8 – Comparação múltipla para IL-4 mensuradas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função dos grupos experimentais – São Paulo – 2012..... 87

Tabela 9 – Comparação múltipla para TNF-α mensuradas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função dos grupos experimentais – São Paulo – 2012..... 87

Tabela 10 – Comparação múltipla para IFN-γ mensuradas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função dos grupos experimentais – São Paulo – 2012.....88
Tabela 11 – Comparação entre as concentrações das citocinas séricas e lácteas obtidas da totalidade dos animais selecionados neste estudo – São Paulo – 2012 89
Tabela 12 – Contribuição dos grupos experimentais para formação do delta entre as concentrações de citocinas no leite e no sangue dos animais – São Paulo – 2012 91
Tabela 13 – Coeficientes de variação das citocinas séricas divididas de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012.....99
Tabela 14 – Valores do leucograma de bovinos sadios, em número absoluto e contagem diferencial relativa, utilizados como referência neste estudo – São Paulo – 2012.....112
Tabela 15 – Valores das médias, medianas, desvios-padrões, mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e linfócitos das amostras de sangue dos animais triados durante o estudo – São Paulo – 2012 120
Tabela 16 – Valores das médias, medianas, desvios-padrões, mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e linfócitos das amostras de sangue das vacas utilizadas no experimento – São Paulo – 2012. 122
Tabela 17 – Resultados médios, medianos, desvios-padrão, mínimo e máximo (CCS/mL) das quantidades de células somáticas verificadas nas 8 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2012 123
Tabela 18 – Resultados médios, mediana, desvio-padarão, mínimo, máximo (pg/mL) e valor de P das quantidades lácteas de IL-10 verificadas nas 8 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2012. 124

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição dos animais avaliados durante o período de triagem de acordo com os resultados no sorodiagnóstico para leucose enzoótica dos bovinos – São Paulo – 2012.....74
Gráfico 2 – Divisão dos animais triados de acordo com os grupos experimentais definidos – São Paulo – 2012 76
Gráfico 3 – Divisão dos animais triados de acordo com os grupos experimentais definidos para este projeto – São Paulo – 2012.....77
Gráfico 4 – Representação dos valores dos leucócitos das amostras de sangue das vacas utilizadas durante o experimento divididas de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012.....79
Gráfico 5 – Representação gráfica das concentrações de IL-1β divididas de acordo com os grupos experimentais – São Paulo - 2012.....84
Gráfico 6 – Representação gráfica das concentrações de IL-4 divididas de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012 85
Gráfico 7 – Representação gráfica das concentrações de TNF-α divididos de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012 85
Gráfico 8 – Representação gráfica das concentrações de IFN-γ divididos de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012 86
Gráfico 9 – Representação gráfica das concentrações das citocinas séricas e lácteas (pg/mL) de toda a população testada – São Paulo – 2012 90
Gráfico 10 – Representação gráfica da variável delta (sangue-leite) de citocinas no grupo experimental Negativo – São Paulo – 2012 92
Gráfico 11 – Representação gráfica da variável delta (sangue-leite) de citocinas no grupo experimental AL – São Paulo – 2012.....92
Gráfico 12 – Representação gráfica da variável delta (sangue-leite) de citocinas no grupo experimental LP – São Paulo - 2012.....93
Gráfico 13 – Distribuição dos animais avaliados durante o período de triagem de acordo com os resultados no sorodiagnóstico para leucose enzoótica dos bovinos – São Paulo – 2012.....119

Gráfico 14 – Divisão dos grupos experimentais negativo e LP de acordo com os resultados no sorodiagnóstico por leucose enzoótica dos bovinos – São Paulo – 2012 121
Gráfico 15 – Representação dos valores dos leucócitos das amostras de sangue das vacas utilizadas no experimento – São Paulo – 2012 122
Gráfico 16 – Representação gráfica da IL-10 nos grupos experimentais – São Paulo – 2012 124

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Propriedades moleculares e bioquímicas das citocinas bovinas – São Paulo – 2012 49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento para a avaliação do perfil de citocinas em vacas naturalmente infectadas pelo VLB – São Paulo – 2012 27
Figura 2 – Representação esquemática da indução e regulação de células Th1 e Th2 pelas citocinas – São Paulo – 2012 32
Figura 3 – Representação esquemática das etapas de triagem e formação dos grupos experimentais correlacionadas às amostras de sangue – São Paulo – 2012 63
Figura 4 – Representação esquemática das etapas de triagem e formação dos grupos experimentais correlacionados ao úbere e amostras de leite – São Paulo – 2012 64
Figura 5 – Representação esquemática da etapa de avaliação das concentrações de citocinas lácteas e séricas – São Paulo – 2012 69
Figura 6 – Representação gráfica das interleucinas séricas divididas de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012 82
Figura 7 – Representação esquemática das etapas de triagem e formação dos grupos experimentais correlacionadas às amostras de sangue – São Paulo – 2012 110
Figura 8 – Representação esquemática das etapas de triagem e formação dos grupos experimentais correlacionados ao úbere e amostras de leite – São Paulo – 2012 111
Figura 9 – Representação esquemática da etapa de avaliação das concentrações de citocinas – São Paulo – 2012 116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL – Alinfocitótica

anti-VLB - Anti-vírus da leucemia bovina

Bcl - 2 - *B-cell lymphoma* 2

BoLA - *Bovine leukocyte antigen*

CAA - Célula apresentadora de antígeno

CD - Cluster de diferenciação

CECS - Contagem eletrônica de células somáticas

cél/mL - Células por mililitro

Con-A - *Concanavalin A*

CMT - *California mastitis test*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ELISPOT - *Enzyme-linked immunosorbent spot*

ESALQ - Escola superior de agronomia Luiz de Queiroz

gp51 - Glicoproteína 51

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HTLV - Vírus linfotrópico T dos humanos

IDGA - Imunodifusão em gel de ágar

IFN – Interferon

IgM - Imunoglobulina M

IL – Interleucina

IL-1ra - Receptor antagonista de interleucina 1

LEB - Leucose enzoótica dos bovinos

LP - Linfocitose persistente

LPS – Lipopolisacarídeo

MHC - *Major histocompability complex*

mL – Mililitro

memTNF - TNF ligada a membrana

N – Negativo

NK - *Natural Killer*

pH - Potencial hidrogeniônico

RNA - Ácido ribonucleico

RNAm - Ácido ribonucléico mensageiro

rpm - Rotações por minuto

RT-PCR - *Real time - polimerase chain reaction*

SP - São Paulo

STLV - Vírus linfotrópico T dos símios

Th - T *helper*

TNF - Fator de necrose tumoral

TNF-R1 - Receptor 1 para TNF

TNF-R2 - Receptor 2 para TNF

USP - Universidade de São Paulo

VLB - Vírus da leucemia bovina

VPS - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 26

2 REVISÃO DE LITERATURA 28

2.1 CITOCINAS: ASPECTOS CONCEITUAIS E FUNCIONAIS 28

2.2 O PAPEL DAS CITOCINAS NA GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA 32

2.3 AS CITOCINAS VS. AS INFECÇÕES 37

2.4 AS CITOCINAS E A LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS 39

2.5 MÉTODOS LABORATORIAIS E SELEÇÃO DE CITOCINAS 47

2.5.1 ELISA 47

2.5.2 Citocinas selecionadas 50

2.5.2.1 IL-1β 50

2.5.2.2 IL-4 51

2.5.2.3 IL-10 52

2.5.2.4 IFN-γ 53

2.5.2.5 TNF-α 55

3 OBJETIVOS 57

3.1 OBJETIVO GERAL 57

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 57

CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS CITOCINAS IL-1β, IL-4, TNF-α E IFN-γ NO SANGUE E NO LEITE DE VACAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS. 58

4 INTRODUÇÃO 59

5 MATERIAL E MÉTODOS 61

5.1 ANIMAIS UTILIZADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 61

5.2 PRIMEIRA FASE 62

5.2.1 Colheita de sangue 64

5.2.2 Sorodiagnóstico para leucose enzoótica dos bovinos 65

5.2.3 Análise hematológica 66

5.2.4 Colheita de leite 66

5.2.5 Testes ao "pé da vaca" 67
5.2.6 Contagem eletrônica de células somáticas (CECS) 67
5.2.7 Exame bacteriológico 68
5.3 SEGUNDA FASE 69
5.3.1 Colheita de sangue 70
5.3.1.1 Quantificação de citocinas 70
5.3.2 Colheita de leite 71
5.3.2.1 Quantificação de citocinas 71
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 72
6 RESULTADOS 73
6.1 ANÁLISE DESCRITIVA 73
6.1.1 Triagem 73
6.1.2.1 Amostras de sangue 76
6.1.2.2 Amostras de leite 79
6.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS 80
6.2.1 Perfil sérico de citocinas 80
6.2.2 Perfil lácteo de citocinas 83
6.2.3 Comparação entre os perfis sérico e lácteo de citocinas 88
7 DISCUSSÃO 94
7. 1 TRIAGEM 94
7.2 PERFIL DE CITOCINAS 96
7.2.1 Perfil sérico de citocinas 96
7.2.2 Perfil lácteo de citocinas 101
7.2.3 Comparações entre os perfis séricos e lácteos das citocinas estudadas 104
CAPÍTULO 2 – QUANTIFICAÇÃO DO PERFIL LÁCTEO DE IL-10 EM VACAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS. 106
8 INTRODUÇÃO 107
9 MATERIAL E MÉTODOS 109
9.1 ANIMAIS UTILIZADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 109
9.2 PRIMEIRA FASE 110

9.2.1 Colheita de sangue 111
9.2.2 Sorodiagnóstico para leucose enzoótica dos bovinos 112
9.2.3 Análise hematológica 113
9.2.4 Colheita de leite 113
9.2.5 Testes ao "pé da vaca" 113
9.2.6 Contagem eletrônica de células somáticas (CECS) 114
9.2.7 Exame bacteriológico 115
9.3 SEGUNDA FASE 115
9.3.1 Colheita de leite 116
9.3.1.1 Quantificação de citocinas 116
9.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 117
10 RESULTADOS 118
10.1 ANÁLISE DESCRITIVA 118
10.1.1 Triagem 118
10.1.1.1 Amostras de sangue 121
10.1.1.2 Amostras de leite 123
10.1.2 Perfil lácteo de IL-10 123
11 DISCUSSÃO 125
11.1 TRIAGEM 125
11.2 PERFIL DE CITOCINAS 127
11.2.1 Perfil Lácteo da IL-10 127
12 CONCLUSÕES 130
REFERÊNCIAS 131

1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de produção pecuários buscam constantemente o aprimoramento de suas técnicas a fim de criar condições para aumento da eficiência produtiva e econômica das criações. Neste contexto há necessidade de maximizar o conhecimento acerca dos animais envolvidos nestes processos, bem como, de investir contra os problemas sanitários que possam interferir nas metas traçadas pelos produtores.

A presença de enfermidades que possam afetar os bovinos, seja por meio de sua ação direta sobre a qualidade de vida dos animais, imposição de perdas econômicas e/ou definição de susceptibilidades, deve ser considerada como um desafio a ser superado em busca de condições ótimas de produção.

A leucose enzoótica dos bovinos (LEB), doença que se encaixa neste quadro, é uma enfermidade de origem viral, infectocontagiosa, linfoproliferativa crônica, com ampla distribuição geográfica. Acomete de forma natural os bovinos e experimentalmente os ovinos (FAUQUET et al., 2004; ASADPOUR; JAFARI, 2010).

Sua importância econômica é decorrente de vários fatores. A essa afecção atribuem-se: perdas na exportação para mercados que requerem animais livres da infecção; prejuízos na produção de leite e seus padrões de qualidade; reduções do ganho de peso; aumento dos custos com o diagnóstico e tratamento das complicações nos animais; descarte prematuro ou morte e condenação de carcaças em frigoríficos (LEUZZI JUNIOR; ALFIERI; ALFIERI, 2001; ERKISNE et al., 2012).

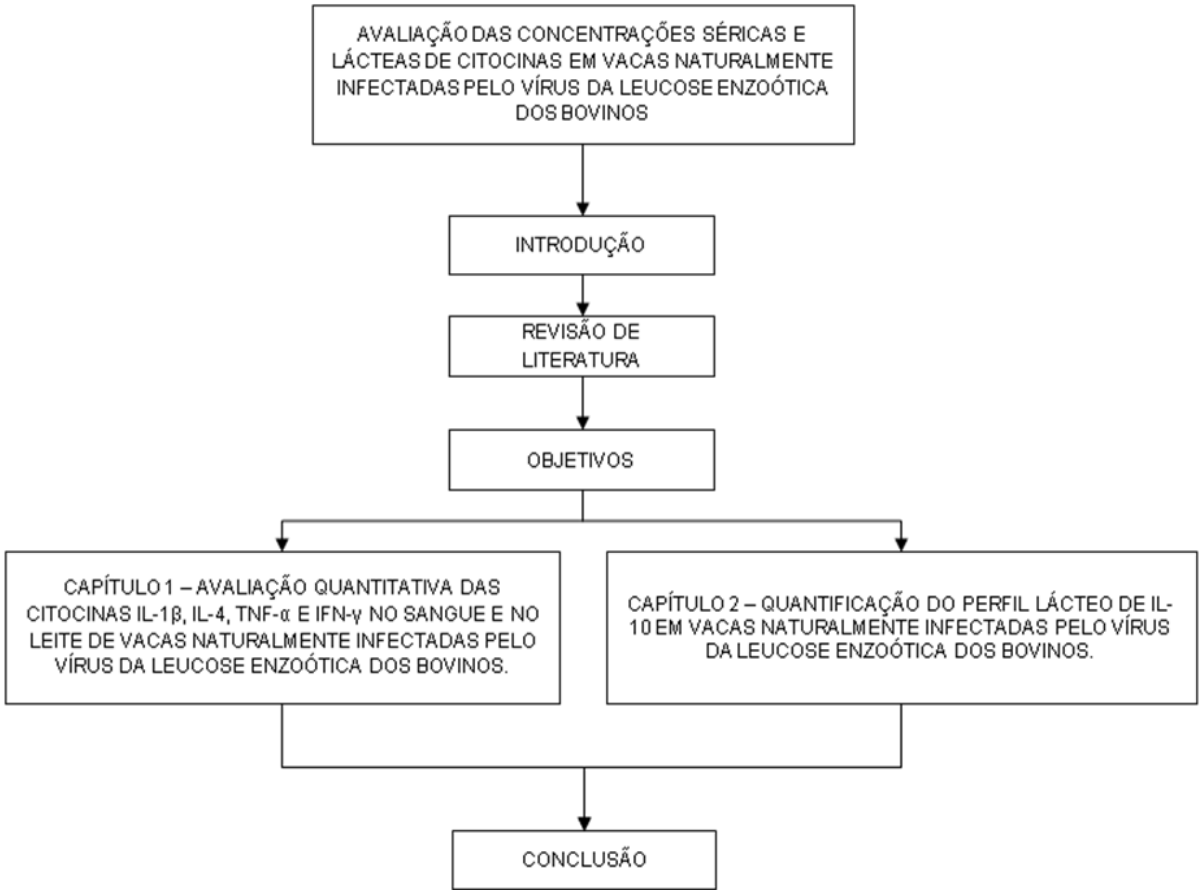
Com base em afirmações de que o vírus da leucemia bovina (VLB), assim como outros retrovírus, é capaz de interagir com o sistema imunológico do hospedeiro promovendo importantes desequilíbrios na produção de citocinas, tanto sistêmicas quanto na glândula mamária, e de que o microambiente criado por estas pode influenciar no direcionamento e cronificação da enfermidade nos bovinos, aventou-se a hipótese que motivou esta revisão, bem como, as experimentações que fazem parte deste estudo (CLERICI et al., 1996; USUI et al., 2007; ZAROS; VIEIRA, 2008).

Desta forma, objetivou-se avaliar a resposta imune contra o VLB em vacas naturalmente infectadas por meio da quantificação de um perfil abrangente de

citocinas presentes tanto no soro sanguíneo como no soro lácteo, minimizados outros aspectos de estimulação induzida do sistema imunológico que não fosse a presença do próprio vírus *in vivo.*

A estrutura de fundamentação e exposição dos resultados definida para este estudo encontra-se representada na figura 1.

Figura 1 – Delineamento para a avaliação do perfil de citocinas em vacas naturalmente infectadas pelo VLB – São Paulo – 2012



2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CITOCINAS: ASPECTOS CONCEITUAIS E FUNCIONAIS

A palavra citocinas tem sua origem etimológica no grego "*cito*" traduzido à língua portuguesa pela palavra célula e "*kinin*" que suporta, em português, o sentido de hormônios e/ou movimentos (TAYAL; KALRA, 2008). Associando-se a etimologia ao conceito podemos definir citocinas como um grande e heterogêneo grupo de proteínas solúveis de baixo peso molecular, semelhantes a hormônios, que atuam na comunicação intercelular durante os processos de hematopoese, estresse, inflamação, crescimento e diferenciação celular, em vários sistemas fisiológicos e patológicos, e na mediação e regulação de muitos aspectos da imunidade inata e adaptativa (ROTHWELL; LUHESHI; TOULMOND, 1996; ALLUWAIMI, 2004; TAYAL; KALRA, 2008; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Este grande e crescente grupo de polipeptídeos compreende as interleucinas (citocinas que regulam as interações entre os linfócitos e outros leucócitos), as quimiocinas (família de pequenas proteínas que exercem um papel importante na inflamação e agem primariamente como fatores quimiotáxicos ou como ativadores de leucócitos), os fatores de necrose tumoral (produzidos por macrófagos e células T, promovem morte celular programada em algumas células tumorais, embora não seja esta sua função primária, e estão normalmente envolvidas na regulação das respostas imunes e inflamação), interferons (sintetizados em resposta a infecções virais, estimulação imune ou vários estimuladores químicos, inibem a replicação viral por interferirem com o RNA e a síntese proteica viral), os fatores estimulantes de colônias e os fatores de crescimento (grupo de citocinas que estimulam o crescimento de muitas células e são, consequentemente, muito importantes para assegurar o suprimento de células de defesa) (ROTHWELL; LUHESHI, 1994; TIZARD, 2009).

Citocinas são produzidas e secretadas por diversas células do sistema imune, bem como, por uma grande variedade de outras células que não são consideradas propriamente representantes clássicos deste sistema. Neste contexto encontram-se

os fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais entre outras. Ressalta-se, porém, que apesar destas proteínas serem produzidas por vários tipos celulares, os produtores predominantes são os linfócitos e macrófagos (GORCZYNSKI; STANLEY, 2001; COHEN; BIGAZZI; YOSIGAHIDA, 2004; TAYAL; KALRA, 2008).

Os linfócitos são subdivididos em dois principais grandes grupos: Linfócitos T e B. Os linfócitos T podem ser classificados em linfócitos γδ, cujo papel nos bovinos frente a patógenos ainda é pouco conhecido, mas parece estar envolvido na citotoxicidade contra as infecções virais (CICCARESE; LANAVE; SACCONE, 1997; LUNDBERG; SPLITTER, 2000)**,** e em linfócitos T αβ, nos quais estão inclusos os linfócitos T *helper* (CD4+) (fenótipo mais prevalente no sangue periférico) e os linfócitos T citotóxicos (CD8+) (ASSAI et al., 1998).

Os linfócitos T CD4+ participam da resposta imune pelo reconhecimento do antígeno e subsequente diferenciação em suas subpopulações efetoras T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2). Por sua vez, os linfócitos Th1 facilitam a resposta imune celular ou citotóxica pela produção de citocinas como a IL-2, IFN-γ e TNF-α, enquanto as células Th2 secretam, principalmente, IL-4, IL-5 e IL-10, que auxiliam os linfócitos B na produção de anticorpos, facilitando a resposta imune humoral (MITELMAN et al., 2009). Em resumo quando há produção de citocinas de padrão Th1, se tem o predomínio da resposta imune do tipo celular e somente uma fraca e transitória produção de anticorpos. Por outro lado, quando há produção de citocinas do perfil Th2, a resposta imunitária predominante será humoral (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996).

Pode-se dizer ainda, de maneira bastante simplificada, que as citocinas com padrão Th1 são aquelas responsáveis por processos pró-inflamatórios enquanto as citocinas com padrão Th2 são as responsáveis pelos processos anti-inflamatórios (PAUL; SEDER, 1994; BROWN et al., 1998; ODBILEG et al., 2005).

Como exposto acima existem citocinas que podem ser consideradas propriamente pró-inflamatórias, pois maximizam diferentes etapas na resposta imunológica, dentre elas estão a IL-1, IL-2, IL-6, IL-9, IL-12, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-20, TNF e IFN-α. Outras citocinas atuam preferencialmente na maturação celular, sendo exemplos principais a IL-3, IL-7, IL-9, IL-11 e os fatores estimuladores de crescimento de colônias. A IL-4, IL-5, IL-6 atuam na defesa contra parasitas tendo também importância nos processos alérgicos e anti-inflamatórios. Há também

citocinas que atuam como imunomoduladoras, como a IL-2, TNF-γ, IL-10, IL-13, IL-19 sendo que a IL-10, IL-13 e IL-19 são consideradas por alguns autores como citocinas imunossupressoras (VARELLA; FORTES, 2001).

A ativação de células Th1 e/ou Th2 é determinada pelo tipo de patógeno ou antígeno que entra em contato com estas células. Acredita-se que os patógenos intracelulares, como algumas bactérias, vírus e protozoários direcionem uma resposta do tipo Th1, enquanto que helmintos e parasitas extracelulares caracterizem prioritariamente respostas Th2 (LIEW, 2002). Entre os demais fatores que influenciam a polarização destas respostas, destacam-se o microambiente no qual ocorre a apresentação dos antígenos e o tipo de célula apresentadora de antígeno (CAA) envolvida, pois antígenos apresentados por macrófagos tendem a estimular respostas do tipo Th1, e aqueles apresentados pelas células B, incitam respostas Th2 (ZAROS; VIEIRA, 2008).

De maneira geral, as citocinas não são armazenadas como moléculas pré-formadas e sua síntese é comumente iniciada por sinais emanados pelo contato entre moléculas, bem como pela ativação de receptores que desencadeiam uma série de interações moleculares que irão resultar na ativação de fatores de transcrição específicos a cada tipo celular. Essa ativação é transitória, e as moléculas de RNA mensageiro (RNAm) que codificam a maioria das citocinas são instáveis e com frequência rapidamente degradadas, de modo que a síntese das citocinas também costuma ser transitória e não continuamente expressa (VARELLA; FORTE, 2001; COHEN; BIGAZZI; YOSIGAHIDA, 2004; ROMAGNANI, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Pode-se dizer portanto, que uma vez sintetizadas as citocinas são rapidamente secretadas resultando em surtos de liberação em resposta a diferentes estímulos indutores (COHEN; BIGAZZI; YOSIGAHIDA, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Uma forte correlação entre os níveis de transcrição de RNAm e o padrão secretório de citocinas liberadas pelos linfócitos T já parece bem estabelecida (OLIVEIRA et al., 1998).

Sua forma de atuação é diversificada, podendo atuar de maneira autócrina, afetando o comportamento das próprias células que as liberam, ou de forma parácrina, interferindo no comportamento das células adjacentes. Algumas citocinas

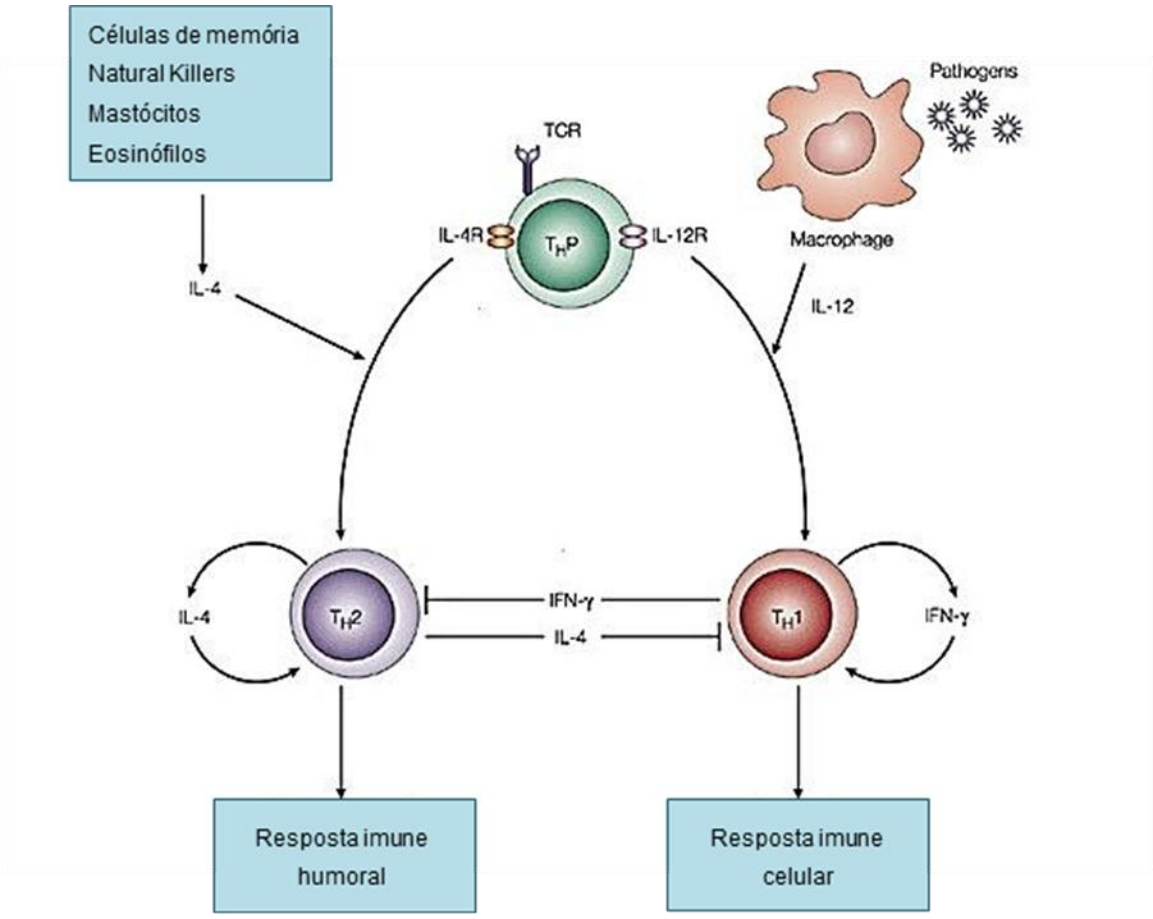
podem ainda atuar de maneira endócrina, afetando o comportamento de células distantes, embora isso dependa de sua capacidade de entrar na circulação e também de sua meia-vida. Esta forma de atuação é menos comum e diretamente associada à citocinas que são produzidas em maior quantidade, situação pouco frequente já que a maioria destas moléculas atua em baixas concentrações (VARELLA; FORTE, 2001; JANEWAY et al., 2002; TIZARD, 2009; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

As citocinas possuem três mecanismos de ação geral, são eles: o pleiotropismo (habilidade de uma única citocina possuir grande variabilidade de efeitos em diferentes tipos celulares), a redundância (capacidade de várias citocinas mediarem efeitos em comum) e o sinergismo ou antagonismo (capacidade de induzir ou inibir a síntese de outras citocinas) (TAYAL; KALRA, 2008; MARTINS, 2009).

Em geral, as citocinas da imunidade inata e da imunidade adaptativa são produzidas por diferentes populações de células, atuam sobre células-alvo diferentes e apresentam propriedades distintas. Todavia, essas distinções não são absolutas, visto que, neste caso também, a mesma citocina pode ser produzida durante respostas imunológicas inatas e adaptativas, e diferentes citocinas produzidas durante essas respostas podem ter funções sobrepostas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012) evidenciando os mecanismo de ação expostos acima.

Outro exemplo destes mecanismos pode ser visulalizado na própria dinâmica da indução e regulação das células Th1 e Th2 demonstrada na figura 2. Observa-se que quando o microambiente é marcado preponderantemente pela IL-12 ou pela IL-4 há uma diferenciação das células Th precursoras (Th0) para Th1 e Th2, respectivamente. A IL-4 produzida pelos linfócitos Th2 atua como fator autócrino nas populações de células Th2 promovendo expansão clonal destas células e limitando a proliferação das células Th1. Em contrapartida o IFN-γ promove o crescimento das células Th1, e retarda o crescimento das células Th2 (OLIVEIRA et al., 1998; LIEW, 2002).

Figura 2 – Representação esquemática da indução e regulação de células Th1 e Th2 pelas citocinas – São Paulo – 2012



Fonte: Adaptação, de Liew (2002)

2.2 O PAPEL DAS CITOCINAS NA GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA

A proteção da glândula mamária se dá por uma variedade de mecanismos de defesa que são divididos em duas categorias: imunidade inata e imunidade adaptativa (SORDILLO; STREICHER, 2002).

As defesas celulares do leite e as moléculas solúveis efetoras como citocinas, proteínas de fase aguda e fatores do sistema complemento, representam componentes importantes deste sistema de proteção (BANNERMAN, 2009).

Sob condições normais tais defesas celulares são representadas pelas células somáticas compostas por macrófagos, tipo celular predominante (54 – 83%), seguido por linfócitos (10 – 27%) e neutrófilos (0 – 11%), porém durante alguns quadros infecciosos os neutrófilos tornam-se o tipo celular predominante chegando a valores que superam 95 % das células presentes (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DE ROSA, 1997).

Em glândulas mamárias sadias humanas, suínas e bovinas, os linfócitos T αβ prevalecem e expressam predominantemente o fenótipo CD8+, em contraste ao sangue periférico onde o fenótipo mais prevalente é o CD4+ (ASSAI et al., 1998). Durante quadros infecciosos, os linfócitos T CD4+ prevalecem também dentro da glândula mamária e são ativados em resposta ao reconhecimento dos complexos antígeno-MHC classe II presentes nas células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células B (BROWN et al., 1998).

Células epiteliais, macrófagos e leucócitos residentes são os principais produtores de citocinas na glândula mamária (OVIEDO-BOYSO et al., 2007), porém, vale ressaltar que tais células apresentam menor capacidade produtiva destas proteínas quando comparadas às células do sangue (POLITIS et al., 1991).

McClenahan, Sotos e Czuprynski (2005) apontaram ainda que o número absoluto de células epiteliais encontrados na glândula mamária dá a estas o potencial de serem as principais contribuintes na produção de citocinas contidas no leite e no soro de vacas com mastites experimentalmente induzidas ou naturalmente adquiridas. Todavia ainda não está claro se estas células realmente possuem a capacidade de produzir todas estas citocinas e em que ordem isto aconteceria.

Sabe-se que muitas citocinas são liberadas transitoriamente e atuam localmente nos tecidos, porém, como salientado acima, ainda não é conhecido se as citocinas pró-inflamatórias detectadas no leite durante a mastite são produzidas e/ou liberadas pelas células epiteliais mamárias das cisternas do teto e do úbere, por outras células residentes no tecido mamário, pelos leucócitos migratórios do sangue ou por uma mais provável combinação de todas estas possibilidades (PERSSON WALLER et al., 2003).

Com base em tais questionamentos alguns estudos têm sido realizados com o intuito de elucidar quais seriam as principais fontes de produção e liberação das citocinas nos quadros infecciosos ligados à glândula mamária.

Trabalhando neste sentido e sob a afirmação de que a linfa proveniente dos linfonodos aferentes periféricos pode ser considerada equivalente aos fluídos intersticiais das regiões que drenam, e que as citocinas sejam primariamente liberadas por células dos tecidos adjacentes a mama, Persson Waller et al. (2003) realizaram estudos onde quantificaram citocinas pró-inflamatórias (IL-1β, IL-8, TNF-α e IFN-γ) no leite e na linfa, coletadas a partir dos linfonodos supramamários, aferente e eferente, durante a fase inicial da inflamação induzida por endotoxinas na glândula mamária bovina. Como resultado os autores observaram aumento das concentrações de IL-1β, IL-8 e TNF-α no leite. Em paralelo, um significativo, mas comparativamente menor aumento de IL-8 foi detectado na linfa horas após a indução da mastite com níveis mais elevados nas amostras provenientes dos linfonodos aferentes do que nas oriundas dos linfonodos eferentes. Tal fato pode ser explicado devido a maior parte da IL-8 ser localmente produzida e liberada por células epiteliais na cisterna do úbere, justificando quantidades no ambiente intersticial comparativamente menores na linfa em relação à mama. Já o TNF-α foi detectado na linfa, mas não no leite antes da infusão, corroborando a afirmação de que o TNF-α no leite pode ter sido liberado por leucócitos migratórios ou que suas concentrações sejam oriundas a “fugas” do fluído intersticial vinculadas à migração celular para dentro das cisternas em função de um hipotético enfraquecimento da barreira leite-sangue, associado a aptidão quimiotáxica de algumas citocinas liberadas durante o processo inflamatório.

O papel destas citocinas tanto nas doenças como na saúde da glândula mamária tem sido objeto de muitos estudos. Uma adequada resposta inflamatória deste órgão é essencial para o favorecimento da resolução de quadros infecciosos do úbere (CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

Uma vez dentro do úbere, os patógenos precisam evitar os mecanismos de defesa celulares e humorais. Caso estes invasores não sejam prontamente eliminados iniciarão sua multiplicação na glândula mamária do hospedeiro levando a liberação de toxinas e indução de leucócitos e células epiteliais para a produção de fatores quimiotáxicos, incluindo citocinas pró-inflamatórias como o TNF-α, IL-8, IL-1, eicosanóides como a prostaglandina, radicais de oxigênio e proteínas de fase aguda como a haptoglobina (PERSSON WALLER et al., 2003; CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009; VIGUIER et al., 2009).

Park et al. (1993) reportaram que células somáticas do leite são capazes de iniciar sinais de recrutamento celular da resposta imune do sangue para a glândula mamária após o reconhecimento de patógenos, salientando que os níveis de citocinas podem sofrer importantes variações em função deste reconhecimento (ALLUWAIMI, 2004; CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

Tal fato pode ser evidenciado em estudos onde células somáticas do leite isoladas a partir de quartos mamários infectados por *E.coli* e *S. aureus* demonstraram aumento diferentes nos níveis de RNAm de citocinas pró-inflamatórias com a IL-6, IL-8, IL-12 e TNF-α. Nestes mesmos estudos células dos quartos mamários não infectados expressaram somente citocinas imunoregulatórias como a IL-4, IL-10 e IFN-γ (PARK et al., 1993; ALLUWAIMI et al., 2003; PELI et al., 2003; LEE et al., 2006).

Outro exemplo desta situação pode ser observado no estudo realizado por Huynh, Robitaille e Turner (1991) com células epiteliais mamárias, onde observou-se que estas expressaram IL-8 quando estimuladas por LPS ou por *S. aureus*. Neste mesmo sentido McClenahan, Sotos e Czuprynski (2005) observaram que células epiteliais mamárias possuem a habilidade de produzir rapidamente citocinas como a IL-1α, IL-1β, IL-8 e TNF-α em resposta a estimulação com LPS.

Lahouassa et al. (2007) avaliaram a capacidade das células epiteliais mamárias induzirem resposta inflamatória e participarem do recrutamento de neutrófilos para a glândula mamária no início de uma infecção estafilocóccica. Neste estudo as células não infectadas expressaram valores de transcrição muito baixos de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1β e TNF-α, porém estas células foram hábeis na secreção de TNF-α após a estimulação bacteriana. Ressalta-se que a cinética desta liberação diferiu de acordo com o tipo de bactéria envolvida. Infecções por *S. aureus* induziram uma liberação precoce e transitória de TNF-α após 3 horas de cultura, diferente do ocorrido frente a *E. coli* que induziu liberações mais tardias e contínuas de 10 a 24 horas após a infecção.

Neste mesmo estudo, Lahouassa et al. (2007) verificaram que não houve expressão de IL-10 em células epiteliais mamárias infectadas ou não. Ainda na visão dos autores este resultado sugere fortemente que as células epiteliais mamárias bovinas não são fonte de IL-10, uma importante citocina imunoreguladora dos

quadros inflamatórios, no leite derivado de glândulas mamárias infectadas (BANNERMAN et al., 2004).

Enfim, vários estudos tem documentado aumentos significativos das citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-6, IL-8, IFN-γ e TNF-α, no leite e no soro de bovinos em resposta a infecções intramamárias (BANNERMAN et al., 2004; MC CLENAHAN; SOTOS; CZUPRYNSKI, 2005), porém como apontado anteriormente com padrões diferenciados induzidos nas células do sangue e do leite por diferentes patógenos, como esperado (RINALDI; LI; CAPUCO, 2010).

Citocinas como IL-1β, IL-6, TNF-α e IFN-γ, assim como elementos celulares e anticorpos, também estão presentes no colostro bovino e parecem associadas ao recrutamento de linfócitos para o intestino de neonatos e auxílio no desenvolvimento da imunidade normal destes animais (HAGIWARA et al., 2000; CHASE; HURLEY; REBER, 2008). Contudo, também neste caso, ainda não está claro se estas citocinas são secretadas na glândula mamária, produzidas pelos leucócitos encontrados no colostro ou por ambos (CHASE; HURLEY; REBER, 2008).

Citocinas também podem ser consideradas ferramentas promissoras para o diagnóstico e avaliação prognóstica do úbere. A disponibilidade de citocinas naturais e/ou recombinantes apoiam as investigações sobre a aplicação destas substâncias para prevenir a mastite ou para aumentar a eficácia antimicrobiana no úbere (BLECHA, 1991). Segundo Gheezzi[1] (1997 apud ALLUWAIMI, 2004, p. 211) algumas estratégias terapêuticas têm sido introduzidas com manipulação clínica das citocinas por meio de: (1) bloqueio da produção de citocinas, (2) estimulação de vias inibitórias, (3) remoção de algumas citocinas da circulação, (4) inibição da ligação das citocinas ao seu receptor e (5) inibição de mecanismos de sinalização.

Sordillo e Daley (1995), relatam dados não-publicados onde comparam o tratamento da mastite bovina por *S. aureus* com antibiótico e com antibiótico associado a IL-1β recombinante bovina. Neste caso os resultados encontrados apontam para uma melhora terapêutica do segundo em relação ao primeiro protocolo.

---

[1]GHEEZI, P. Pharmacologically-oriented introduction to the cytokine network. **Proceedings of the Euroconference, Cytokines: Tools and targets for tomorrow's therapies**. France, Institut Pasteur, p. 15-17, 1997.

Outro exemplo da aplicação de citocinas no tratamento da glândula mamária bovina pode ser visto na publicação de Zecconi et al. (2009) onde os autores demonstram significativo aumento na atividade de leucócitos e na quantidade de células somáticas do leite em vacas tratadas com IL-2 recombinante bovina, uma importante citocina secretada por linfócitos T e que deflagram a replicação e diferenciação clonal de outras populações de células T *helper* e citotóxicas. Além disso, entre suas diferentes atividades a IL-2 pode aumentar a produção de outras citocinas como o IFN-γ que é de suma importância na estimulação da atividade microbicida dos leucócitos (ZECCONI et al., 2009).

Tal fato indica que citocinas possam realmente atuar como coadjuvantes no tratamento de mastites, melhorando a eficácia e provavelmente diminuindo o descarte da produção leiteira pela presença de antibióticos (ARAUJO; GHELLER, 2005).

2.3 AS CITOCINAS VS. AS INFECÇÕES

O balanceamento das citocinas possui papel crucial sobre a saúde e a doença tanto em humanos quanto em outros animais (ODBILEG et al., 2005).

Doenças autoimunes podem ocorrer, por exemplo, quando citocinas pró-inflamatórias não são adequadamente controladas ou mesmo quando citocinas imunoreguladoras encontram-se ausentes (WACK; OPENSHAW; O'GARRA, 2011).

Diferentes perfis na produção de citocinas ocorrem de acordo com o patógeno envolvido e podem muitas vezes determinar o curso da doença, uma vez que distúrbios no equilíbrio da produção e liberação destas proteínas têm papel significativo no desencadeamento e agravamento de diversas enfermidades (RIOLLET; RAINARD; POUTREL, 2000; VARELLA; FORTES, 2001).

Nas infecções bacterianas sistêmicas a resposta imune do hospedeiro inclui a produção tanto de citocinas pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias. Citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β, IL-2, IL-6 e IFN-γ promovem a ativação de macrófagos, aumentam a imunidade celular e elevam a síntese de proteínas de fase aguda. Já citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 possuem funções

imunoregulatórias e dão suporte ao desenvolvimento da resposta imune humoral por meio da promoção da diferenciação das células B e subsequente produção de anticorpos (BURTON et al., 2009).

Ainda neste contexto, em bebês humanos o perfil de citocinas no sangue periférico tem sido utilizado para a identificação de quadros sépticos (LAM; NG, 2008). Da mesma maneira, as respostas de citocinas nas células mononucleares do sangue periférico de equinos recém-nascidos também têm sido avaliadas sob o aspecto de significância de prognóstico e diagnóstico de sepse, uma das principais causas de mortalidade nesta categoria animal (PARADIS, 1994). Burton et al. (2009) apontam a relação entre IL-6:IL-10 como a mais importante fonte indicadora de prognóstico, com valores significativamente maiores em animais saudáveis em comparação a potros com sepse.

No caso de bactérias intracelulares como a *Brucella abortus* uma boa proteção imunológica usualmente requer a combinação de diferentes elementos do sistema imune para orquestrar respostas celulares que levem a proteção. A resistência contra patógenos intracelulares facultativos depende tanto da imunidade celular adaptativa quanto da ativação de macrófagos por linfócitos T (OLIVEIRA et al., 1998).

Monócitos humanos estimulados *in vitro* com *Brucella abortus* expressam RNA mensageiro para IL-12 quatro horas após a estimulação e secretam esta citocina após 24 horas (ZAITSEVA et al., 1996). Esta produção inicial de IL-12 durante as infecções por *B. abortus* é fundamental para a ativação da via de produção de IFN-γ pelas células Th1 (OLIVEIRA et al., 1998). Já em bovinos, células mononucleares do sangue periférico desafiadas com *Brucella* mostram uma elevação na transcrição de IFN-γ, mas não de IL-2 ou IL-4 quando comparados com células mononucleares de animais sadios (OLIVEIRA et al., 1998).

Já as infecções virais agudas e crônicas contribuem de forma significativa para problemas globais de saúde. Diversos autores defendem que possíveis desbalanceamentos na rede de citocinas possam ser responsáveis pela ineficiência na eliminação viral podendo levar a cronificação de processos ou até mesmo a morte do hospedeiro quando a ação destas citocinas é qualitativamente fraca (PETERSON et al., 2004; TAYAL; KALRA, 2008; WACK; OPENSHAW; O'GARRA, 2011).

Os vírus são capazes de interferir com as funções das citocinas em vários níveis: podem inibir a síntese ou o processamento das citocinas, bloquear a ligação das citocinas nos receptores celulares do hospedeiro, interromper eventos celulares iniciados pelas citocinas após sua ligação com receptores específicos e influenciar na natureza da resposta imune do hospedeiro (Th1 ou Th2) pela expressão de suas próprias citocinas (SMITH, 1996).

Este desequilíbrio entre a produção de citocinas do tipo Th1 e Th2 é geralmente considerado como umas das causas da cronificação das infecções por retrovírus. Um exemplo desta situação pode ser observado nas infecções pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) onde a troca da predominância das citocinas do perfil tipo 1 para o tipo 2 está correlacionada a progressão da doença (CLERICI et al., 1996; USUI et al., 2007).

2.4 AS CITOCINAS E A LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS

A família *Retroviridae* é composta por um grande número de vírus que podem ser encontrados, em praticamente, todos os vertebrados. Dentre os retrovírus de importância em medicina veterinária, destacam-se o vírus da leucose enzoótica dos bovinos, vírus da anemia infecciosa equina, o Maedi-Visna de ovinos e o vírus da artrite encefalite caprina, entre outros (RAVAZZOLO; COSTA, 2007).

O vírus da leucemia bovina (VLB), um membro da família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae* e gênero *Deltaretrovirus*, é o agente etiológico da Leucose enzoótica dos bovinos (LEB), uma doença infectocontagiosa, linfoproliferativa crônica, com ampla distribuição geográfica, que acomete bovinos de forma natural e experimentalmente os ovinos (FAUQUET et al., 2004; ASADPOUR; JAFARI, 2010).

O VLB possui significativa homologia com o vírus T linfotrópico dos humanos (HTLV) dos tipos 1, 2, 3 e 4 e com o vírus T linfotrópico dos símios (STLV) tipos 1, 2, 3 e 5 (INOUE et al., 2011; SILVA FILHO et al., 2011) todavia, além da óbvia discrepância na gama de hospedeiros, uma notável diferença entre estes vírus pode ser observada na predileção do VLB associada às células B CD5+, enquanto que o

HTLV e o STLV afetam principalmente células T CD4+ e CD8+ (FAUQUET et al., 2004; KONNAI et al., 2006).

Similar a outras infecções retrovirais, o VLB infecta geralmente linfócitos B causando longos períodos assintomáticos com baixa expressão gênica e taxa viral (MIRSKY et al.,1996). Ao redor de 33% dos animais infectados desenvolvem linfocitose persistente (LP) caracterizada pela expansão policlonal não maligna de linfócitos B, e de 0,1 a 10% dos animais poderão desenvolver as formas neoplásicas associadas à doença, sendo que, destes, 80% após os 5 anos de idade (SCHWARTZ; LEVY, 1994; STOBER, 2005; MORATORIO et al., 2010; INOUE et al., 2011; ERKISNE et al., 2012).

A importância econômica das infecções pelo VLB é decorrente de vários fatores como perdas na exportação para mercados que requerem animais livres da infecção; aumento dos custos com o diagnóstico e tratamento das complicações dos animais com linfossarcoma; descarte prematuro ou morte de animais, particularmente aqueles de alto potencial genético, devido à ocorrência de linfossarcoma; e condenação de carcaças em frigoríficos com serviço de inspeção veterinária (LEUZZI JUNIOR; ALFIERI; ALFIERI, 2001). Vale ressaltar que apesar da baixa prevalência de animais infectados pelo VLB que desenvolvem a forma de linfossarcoma maligno esta apresentação é um dos principais motivos de condenação de carcaças (>21% das condenações) durante a inspeção *post-mortem* nas linhas de abatedouros nos EUA (ERKISNE et al., 2012).

Enquanto a maioria dos bovinos infectados pelo VLB permanece clinicamente assintomática ao longo de toda sua vida, partículas do VLB são numerosas nos linfócitos da glândula mamária de vacas sororreagentes com mastite. Lesões histológicas, possivelmente causadas pelo vírus, são evidentes e sugerem uma estreita associação entre a LEB e a mastite (RINALDI; LI; CAPUCO, 2010).

No mais, o vírus encontra-se presente em linfócitos sanguíneos e células tumorais, e seu provírus foi detectado por Murakami et al. (2011) em 93,75% das amostras de sangue provenientes de animais infectados, 40,42% da amostras de leite e 50% das amostras de colostro, sendo que este provírus não se integra a um cromossomo ou região do gene do hospedeiro em particular, podendo ser encontrado também na fração celular de diversos fluídos corporais como o sêmen, secreções nasais e brônquicas, saliva e leite (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE

SAÚDE ANIMAL, 2008; ASADPOUR; JAFARI, 2010; GUTIÉRREZ et al., 2011; INOUE et al., 2011; MURAKAMI et al., 2011).

A patogênese da infecção pelo VLB envolve vários fatores ligados ao hospedeiro. Um exemplo deste comportamento pode ser visualizado no polimorfismo de genes que codificam o MHC bovino ("*Bovine Leukocyte Antigen*" – BoLA) e que definem que a presença ou ausência de determinado alelo pode influenciar a apresentação de antígenos do VLB aos linfócitos T e por conseguinte determinar resistência ou susceptibilidade genética do hospedeiro ao surgimento do *status* de linfocitose persistente (JULIARENA et al., 2009).

Wu, Shanks e Lewin (1989) reportaram que vacas infectadas pelo VLB com alto potencial genético para produção de leite e gordura foram mais susceptíveis ao desenvolvimento de LP do que as vacas que apresentam menor potencial genético produtivo. Concluiu ainda que vacas portadoras do *status* de LP não produziam leite e gordura em acordo a seu valor genético preditivo de produção. Adicionalmente, o alelo que codifica o complexo de histocompatibilidade maior classe I (BoLA-A) e que está associado a resistência a LP é também associado a um potencial aumento da capacidade de produção e longevidade destes animais (DA et al., 1993).

Todavia, apesar destes conhecimentos o mecanismo total da progressão da doença ainda é pouco conhecido (USUI et al., 2006; AZEDO, 2010).

A ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B normais são largamente mediadas pelos linfócitos T, tanto pelo contato direto célula a célula, quanto pela liberação de citocinas. As IL-2, IL-4, IL-10 e IFN-γ atuam isolada e sinergicamente para promover estas ações sobre os linfócitos B (TRUEBLOOD et al., 1998).

A presença prolongada de linfócitos B no sangue pode refletir tanto uma proliferação descontrolada destas células, quanto um acúmulo de células nas quais o processo apoptótico foi comprometido, ou até mesmo uma combinação destes dois fatores (DEBACQ et al., 2003). Foi previamente demonstrado que VLB modula a apoptose espontânea iniciada após curtos períodos em cultura celular. De fato, células ovinas expressando proteínas virais *ex vivo* são completamente poupadas de morte programada correlacionando-se à uma concomitante redução no número de linfócitos B apoptóticos (ALCARAZ et al., 2004).

Azedo et al. (2008) também verificaram que animais sororreagentes para LEB, apresentando *status* de LP, possuíam menor percentual de linfócitos sofrendo processo de apoptose, quando comparados aos animais soronegativos ou àqueles sororreagentes porém AL.

Mecanismos como estes podem ser somados à afirmação de Pyeon, Diaz e Splitter (2000) de que a IL-10 é extensamente produzida por células B CD5+ murinas promovendo aumento de sua sobrevivência por meio da elevação dos níveis da proteína Bcl-2 correlacionada a processos anti-apoptóticos.

Erkisne et al. (2012) defendem que a progressão da LEB afeta substancialmente os mecanismos de defesa do hospedeiro. Assim, animais com ou sem LP demonstrariam expressões gênicas diferentes de citocinas Th1 e Th2. Estas diferenças poderiam então afetar o desenvolvimento da doença e possibilitar o direcionamento para os estágios alinfocitóticos ou de linfocitose persistente.

Yakobson et al. (2000) sugerem que um aumento na expressão inicial de citocinas ligadas a resposta imune celular como a IFN-γ e IL-2 mantêm os animais em *status* alinfocitótico atrasando a progressão da doença para o estágio de linfocitose persistente. Já a perda predominante da expressão de citocinas ligadas à resposta imune celular (IL-12, IFN-γ e IL-2) e a rápida mudança para expressão de citocinas ligadas a resposta imune humoral (IL-10) foi característica em animais que desenvolveram *status* de LP rapidamente após a infecção pelo VLB (YAKOBSON et al., 1998). Outros estudos apontam que animais AL expressam níveis mais elevados de IFN-γ e IL-12, associados a baixos níveis de expressão de IL-10 e que animais que desenvolvem LP expressam baixas concentrações de IL-2 e altos níveis de IL-10 (BURDIN et al., 1995).

Concentrações de algumas citocinas do tipo Th1 (incluindo IL-2, IL-12, e IFN-γ) encontram-se reduzidas nos animais infectados pelo VLB sugerindo que esta produção alterada de citocinas possa ter sua parcela de responsabilidade na supressão da proliferação mitótica dos linfócitos T (SORDILLO; HICKS; PIGHETTI, 1994; STONE; HOF; DAVIS, 1995). Evidências como estas sustentam que a progressão para LP mostra-se correlata à disfunção dos linfócitos T CD4+ em resposta ao antígeno VLB (SORDILLO; HICKS; PIGHETTI, 1994; YAKOBSON et al., 2000).

Ainda neste sentido e levando em conta que citocinas são fundamentais na estimulação e regulação destes linfócitos, Trueblood et al. (1998) defenderam a hipótese de que um ambiente de citocinas estimulante para as células B seria necessário para o desenvolvimento e manutenção da população destes linfócitos durante os quadros de linfocitose persistente induzidos pelo VLB. Células mononucleares do sangue de vacas infectadas pelo VLB apresentando LP foram estimuladas com Con-A e apresentaram expressão elevada de RNAm para IL-2 e IL-10, suportando o descrito acima. O mesmo comportamento foi observado por Pyeon, O'Reilly e Splitter (1996) que reportaram expressões aumentadas de IL-10 em macrófagos de bovinos com *status* de LP.

Resultados reportados por Konnai et al. (2003) e Amills et al. (2004) apontam a avaliação do perfil de citocinas nas células mononucleares do sangue periférico sugerindo que tanto citocinas do tipo Th1 como as do tipo Th2 encontram-se alteradas, sendo que há aumento nas concentrações de IL-10 e IL-4 e diminuição nas concentrações de IL-2, IL-12 e IFN-γ (TRUEBLOOOD et al., 1998).

Em contrapartida Keefe et al. (1997) não observaram diferenças significativas entre animais infectados pelo VLB e não infectados quanto as concentrações de IL-4 e IL-10. Neste sentido ressalta-se que Amills et al. (2004) defendem que linfócitos B séricos de bovinos não expressaram quantidades detectáveis de RNAm IL-10 *in vivo,* sugerindo que a secreção autócrina desta citocina não seja essencial à manutenção do subtipo CD5+ das células B nestes animais.

Amills et al. (2002) também observaram redução de IL-2 em animais sororreagentes para a LEB com LP. Em outro estudo Keefe, Ferrick e Stott, (1997) reportam aumento de IL-2 e IFN-γ, porém em células de animais negativos para a LEB, o que não anula a possibilidade de que os demais resultados apresentados acima de que o perfil de citocinas Th1 esteja aparentemente reduzido nos animais sororreagentes para a LEB.

A análise pela técnica de RT-PCR competitiva, para detectar a expressão do RNAm para o interferon-gama (IFN-γ), característico de uma resposta celular, foi realizada em bovinos experimentalmente infectados com o VLB. Os resultados mostraram, em animais que desenvolveram LP, aumento da síntese de IFN-γ durante a terceira e quarta semana após a infecção. Por outro lado, os animais sororreagentes e assintomáticos expressaram altos níveis de RNAm para o IFN-γ

durante todas as semanas do experimento (1-24 semanas). Estes resultados sugerem que animais que possuem uma expressão precoce e prolongada de IFN-γ também poderiam retardar ou inibir o aparecimento do *status* de linfocitose persistente (YAKOBSON et al., 2000).

Murakami et al. (2004) examinaram os efeitos da aplicação de IFN-γ recombinante bovina em animais infectados pelo VLB. Todos os animais envolvidos apresentaram febre após a inoculação por até 48 horas. O número de linfócitos do sangue periférico, células T CD4+ e CD8+, diminuíram por dois ou três dias e recuperaram níveis normais na maioria dos bovinos. Já o número de linfócitos γδ aumentou após a febre e permaneceram em níveis significativamente altos em alguns dos bovinos infectados pelo VLB. O número de células IgM+ e de sincícios foram reciprocamente diminuídos quando comparados ao aumento das células T γδ. Com base nestes dados os autores defenderam a hipótese de que células T γδ podem ser ativadas pelo IFN-γ e eliminar células IgM+ infectadas pelo VLB em bovinos.

Em função destes achados os autores sugerem que a ativação de células T γδ, bem como de linfócitos T CD8+, possam ser uma possibilidade importante para a terapia de bovinos infectados pelo VLB já que há grandes quantidades de células T γδ em ruminantes comparados a outras espécies. Assim, os resultados ligados a expressão aumentada de RNAm de IFN-γ em animais sororreagentes sem LP podem sugerir o envolvimento de células T γδ na resistência a infecção pelo VLB (CICCARESE; LANAVE; SACCONE, 1997).

A expressão de RNAm TNF-α e de memTNF-α nas células B CD5+ de bovinos infectados pelo VLB com altas concentrações de provírus ou apresentando quadro de linfossarcoma foi elevada quando comparada aos bovinos negativos ou infectados pelo VLB mas que apresentassem baixas concentrações de provírus (AMILLS et al., 2004; KONNAI et al., 2006). Neste estudo o TNF-α também foi demonstrado como um fator de crescimento envolvido na proliferação de células mononucleares do sangue derivadas de animais com linfocitose persistente, sugerindo que nas fases iniciais da infecção esta citocina possa estar envolvida nas tentativas de eliminação do VLB.

Com base nos resultados obtidos, Konnai et al. (2006) sugeriram que a elevação do TNF-α e do TNF-R2 poderiam modular as interações celulares de

maneira autócrina ou parácrina, e que efeitos diretos e indiretos do TNF-α incluindo a proliferação celular ou resistência a apoptose poderiam ser importantes durante a fase tardia de progressão da LEB, como na LP e no linfossarcoma (KONNAI et al., 2006). No entanto a proliferação celular espontânea em questão não pôde ser completamente bloqueada por anticorpos contra TNF-α, o que torna ainda mais provável a influência da IL-2 na proliferação celular como apontado por Trueblood et al. (1998) e descrito anteriormente.

Em conjunto estes achados sugerem que o desequilíbrio entre as citocinas pode efetivamente influenciar a progressão da enfermidade rumo a alinfocitose ou linfocitose persistente.

Análises de RNAm de citocinas em células mononucleares do sangue periférico realizadas por Yokoyama e Osawa (1979) não detectaram nenhuma atividade aparente o que não era totalmente inesperado uma vez que estas células não são típica e continuamente ativadas. Da mesma maneira expressões de RNAm das citocinas IL-1β, IL-6 e IL-10 foram pobremente detectadas por Amills et al. (2004) em células mononucleares do sangue provenientes de animais com LEB. Contudo após curto período de permanência destas células em cultura, os autores observaram drástico aumento na expressão de RNAm destas citocinas. A principal conclusão que se pode tirar sobre o relatado acima é que a atividade transcripcional dos genes que codificam tais citocinas é diminuída em células B bovinas frescas, mas podem aumentar rapidamente após curto período em cultura. Enfim, pode se inferir que tais condições associadas à cultura celular podem facilitar ativações não específicas de células T e/ou B (KEEFE et al., 1997).

Ovinos são frequentemente utilizados como modelo experimental para infecções pelo VLB (USUI et al., 2007) e embora ovelhas infectadas possam ser consideradas um bom modelo para o estudo da leucemogênese *in vivo*, os dados obtidos devem ser observados com parcimônia afinal esta espécie não é um hospedeiro natural para este vírus (DEBACQ et al., 2003). Nestes animais tanto a imunidade humoral quanto celular estão induzidas, e desempenham importante papel na proteção do hospedeiro (YAKOBSON et al., 2000; KABEYA et al., 2001). Este modelo ainda é preferido por muitos pesquisadores em decorrência da facilidade de manejo e pelo fato da enfermidade, nesta espécie, evoluir de forma particularmente aguda e mais habitual do que nos bovinos (FLORINS et al., 2008).

Kabeya et al. (1999) encontraram a expressão de RNAm do TNF-α significativamente mais ativa nas fases iniciais da infecção experimental em ovinos, resultando na eliminação das células infectadas (KABEYA; OHASHI; ONUMA, 2001).

Usui et al. (2006) apontam a associação entre a expressão de TNF-α com a proliferação de células B em ovinos infectados por VLB. Com base nestas informações os autores sugerem que memTNF-α induzidos na superfície da células B possam suportar a expansão celular nos animais linfocitóticos infectados pelo vírus por possuir efeitos autócrinos nestas células via ativação do TNF-R2 ou pela modulação com a interação com outros tipos celulares, como as células T *helper*.

Ainda neste sentido foi demonstrado que a atenuação da expressão de RNAm do TNF-R1 está associada com linfocitose em ovinos experimentalmente infectado pelo VLB (KABEYA; OHASHI; ONUMA, 2001).

Kabeya et al. (1999) observaram que a expressão de RNAm TNF-α foi significativamente elevada em ovinos resistentes ao VLB, enquanto a redução do TNF-α foi observada nos ovinos susceptíveis.

No experimento realizado por Usui et al. (2007) apesar das doses de infecção experimental com VLB serem iguais, a propagação viral foi marcantemente diferente entre os ovinos individualmente. Após a infecção pelo VLB em 3 dos 8 indivíduos envolvidos no estudo o vírus não se propagou bem, mostrando ainda aumento na expressão de RNAm IFN-γ, um forte indicador de imunidade celular. Esta correlação inversa entre a expressão do RNAm IFN-γ e a adequada propagação do VLB dão a ideia de que uma indução eficiente da imunidade celular contra o VLB pode ser necessária para que o hospedeiro possa suprimir a propagação viral nas fases iniciais da infecção. Ainda na visão de Usui et al. (2007) a diferença na resposta do IFN-γ contra a infecção viral pode estar associada com uma variação na susceptibilidade a infecção pelo VLB entre os animais individualmente.

Ovelhas susceptíveis a propagação viral obtiveram aumento no número de linfócitos B circulantes quando comparadas às ovelhas que não apresentaram este desenvolvimento. Tais achados sugerem a possibilidade de que as respostas aumentadas no IFN-γ dos ovinos com baixa taxa proviral contribuam para a proteção da progressão da linfocitose (MOND et al., 1986).

Com base nos múltiplos efeitos do IFN-γ na infecção pelo VLB, a expressão aumentada do IFN-γ em ovinos resistentes a propagação viral sugerem que células infectadas pelo VLB podem ser diretamente ou indiretamente eliminadas pela imunidade celular (USUI et al., 2007) e que os altos níveis de transcrição de IFN-γ observados em ovelhas com baixa propagação viral pode não apenas estimular a imunidade celular, mas também contribuir para a direta inibição da replicação viral nas células infectadas pelo VLB (USUI et al., 2007).

2.5 MÉTODOS LABORATORIAIS E SELEÇÃO DE CITOCINAS

Para o estudo ao qual esta revisão dá embasamento foram selecionadas as interleucinas IL-1β, IL-4 e IL-10, além do Fator de Necrose tumoral-α (TNF-α) e o Interferon-γ (IFN-γ). Tal escolha justifica-se pela disponibilidade de kits para a realização do ensaio, bem como por sua importância diante da literatura já publicada com foco na leucose enzoótica dos bovinos.

Este perfil explica-se ainda por seu ecletismo já que possui citocinas com padrões pró-inflamatórios ou Th1 (IL-1β, TNF-α e IFN-γ) e anti-inflamatórios ou imunoreguladores (IL-4 e IL-10), além de sua representatividade para o controle, diagnóstico e prognóstico dos acometimentos que envolvem os bovinos e suas glândulas mamárias em função das ações do VLB.

Em função do exposto são apresentados nos próximos tópicos breve detalhamento conceitual e funcional das citocinas em questão, bem como do método de ELISA (Ensaio de Imunoabsorção por ligação enzimática) utilizado para a mensuração das concentrações séricas e lácteas destas proteínas.

2.5.1 ELISA

Um entendimento mais aprofundado dos padrões de citocinas, bem como, o mapeamento de múltiplas citocinas em fluídos corporais durante a resposta

imunológica associada a diferentes infecções, pode ser de significativa importância para o curso e diagnóstico das enfermidades. Para tanto, técnicas confiáveis, rápidas e baratas para a análise de citocinas bovina fazem-se necessárias (DERNFALK; PERSSON WALLER; JOHANISSON, 2007).

Neste contexto existem vários métodos que permitem a quantificação das concentrações de citocinas em nível proteico (ELISA, Elispot, testes biológicos, marcação de citocinas intracelulares) e por seu RNA mensageiro (*Northern blots*, hibridização *in situ*, teste de proteção de ribonuclease, RT-PCR) (LEUTNEGGER et al., 2000). Obviamente todos estes métodos apresentam limitações (DERNFALK; PERSSON WALLER; JOHANISSON, 2007).

Os ensaios de ELISA são, provavelmente, os mais amplamente utilizados entre os métodos imunológicos empregados na medicina veterinária (LEQUIN, 2005; TIZARD, 2009).

A técnica é baseada na visualização da reação antígeno-anticorpo por meio de uma reação colorimétrica. O anticorpo é conjugado a uma enzima, formando um complexo proteico, em que a porção do anticorpo se liga ao antígeno e a porção da enzima possibilita a transformação de um substrato em cor mensurável por espectrometria (TEXEIRA; REIS; JUNIOR, 2003; TIZARD, 2009).

Uma de suas vantagens está na possibilidade de se avaliar várias amostras simultaneamente em um período de tempo relativamente curto, além do que técnicas de imunoensaio que utilizam reagentes marcados para a detecção de antígenos e/ou anticorpos costumam ser bastante sensíveis (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2002).

Ao realizar estudos em imunologia veterinária, a falta de reagentes espécie-específicos torna-se um fator limitante. Os custos iniciais para a produção de anticorpos monoclonais específicos são altos e acabam por ser proibitivos à produção destes elementos para todas as espécies de interesse (HENNING; NIELSEN, 1992). No entanto, a reatividade cruzada entre espécies animais ocorre, tornando possível a utilização de anticorpos e proteínas recombinantes de espécies similares em ensaios imunológicos (PEDERSEN et al., 2002).

Uma reação cruzada pode ser definida como a ligação de um anticorpo a um antígeno outro que não o imunógeno primariamente visado (JANEWAY et al., 2002). Epítopos idênticos ou semelhantes em moléculas aparentemente não relacionadas

podem ser encontrados. Como resultado, os anticorpos direcionados contra um antígeno podem reagir inesperadamente com um antígeno não relacionado. Algumas vezes, os epítopos de uma proteína podem diferir somente em pequenos aspectos da mesma proteína obtida a partir de outra espécie animal. Consequentemente, os anticorpos direcionados contra uma proteína em uma espécie também podem reagir de maneira detectável com a proteína homóloga ou semelhante em outra espécie. Ambos os fenômenos são exemplos de reações cruzadas (TIZARD, 2009).

Suportada por estas bases a análise das sequências de aminoácidos de uma citocina, bem como de sua estrutura tridimensional pode apresentar informações importantes no que tange as possíveis regras que governam a reatividade cruzada de uma determinada citocina com anticorpos de uma espécie diferente (SCHEERLINCK, 1999).

Dados apresentados por Scheerlinck (1999) indicam que é mais provável que uma citocina em particular apresente reação cruzada com outra espécie, se a citocina desta segunda espécie apresentar pelo menos 60% de homologia no perfil de aminoácidos com a citocina da espécie de origem. Scheerlinck (1999) cita ainda que abaixo deste nível, é muito raro encontrar reatividade cruzada entre citocinas de diferentes espécies.

Em revisões realizadas por Alluwaimi (2004) e Odbileg et al. (2005) há o apontamento do grau de homologia e alguns dados estruturais de algumas citocinas bovinas, humanas e murinas, conforme demonstrado no quadro 1.

Quadro 1 – Propriedades moleculares e bioquímicas das citocinas bovinas – São Paulo – 2012

	IL-1β	IL-4	IL-10	TNF-α	IFN-γ
N° de Aminoácidos	150	135	178	233	166
Homologia					
Humana (%)	62	56,9	76,8	81	63
Murina (%)	59	41,7	70,6	74	47

Adaptado de: Alluwaimi (2004); Odbileg et al.(2005).

Como pode ser visualizado no quadro 1 há condições moleculares para que ocorra reatividade cruzada entre as citocinas humana e bovinas para todos os casos selecionados com exceção da IL-4 onde o grau de homologia não atinge os 60% (56,9%) de similaridade sugeridos por Scheerlinck (1999).

2.5.2 Citocinas selecionadas

2.5.2.1 IL-1β

Os genes da família da interleucina-1 codificam três diferentes peptídeos: IL-1α, que se trata da forma ligada a membrana celular, a IL-1β, que é secretada e está envolvida na ativação de células distantes, e o receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) (VARELLA; FORTES, 2001).

Monócitos e macrófagos são as principais fontes desta citocina, produzindo principalmente IL-1β. Outros tipos celulares também podem produzi-la como, por exemplo, as células endoteliais, fibroblastos, miócitos, células de Langerhans e linfócitos T e B (DINARELLO, 1989). Normalmente esta produção é induzida em resposta a estímulos inflamatórios como a presença de TNF-α, IFN-α, β e γ, LPS, vírus e outros antígenos, e regula várias atividades fisiológicas incluindo reações inflamatórias e respostas imunes (DINARELLO, 1989; TOPHAM et al., 1998; TAYAL; KALRA, 2008).

A interleucina 1 é uma citocina que pode interagir com muitas outros tipos celulares para estimular o processo inflamatório (TOPHAM et al., 1998). As atividades biológicas primordiais desta citocina incluem a estimulação da células T CD4+ para que secretem IL-2 e produzam receptores para a IL-2 e a proliferação e ativação de linfócitos B, neutrófilos, monócitos e macrófagos, aumentando as atividades quimiotáticas e fagocitárias. Também estimula a adesão de leucócitos, aumenta a expressão das moléculas de adesão pelas células endoteliais, inibe a proliferação das células endoteliais, aumenta a ativação de coagulação, tendo participação na gênese da coagulação intravascular disseminada. A IL-1 estimula,

ainda, hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda de inflamação (DINARELLO, 1989; VARELLA; FORTES, 2001)

Muitos estudos têm demonstrado que a IL-1 e outras citocinas pró-inflamatórias podem também ser responsáveis pela mediação de sinais do choque séptico agudo (OHTSUKA et al., 2001). Em bovinos, a administração sistêmica de IL-1 pode induzir alguns sinais clínicos associados como febre, inapetência e diurese (GOFF et al., 1992).

As Interleucinas 1α e 1β também têm sido detectadas nas células do leite de bovinos sadios por meio do RT-PCR. A interleucina 1 é crucial no processo inflamatório na glândula mamária infundida com endotoxinas e nas mastites naturais ou experimentais por coliformes (SHUSTER et al., 1997; OKADA et al., 1999).

Nas infecções por *E. coli*, uma importante elevação dos níveis de IL-1 tem sido associado ao influxo de neutrófilos, comprovando seu envolvimento na quimiotaxia para estas células (SHUSTER et al., 1997). Ohtsuka et al. (2001) defendem que o papel central da IL-1 neste tipo de mastite poderia inclusive ser utilizado como um critério para avaliação prognóstica.

A contribuição da IL-1 na resposta à mastite por *S. aureus* é pouco significante ou transitória, o que indica um papel menos importante desta citocina neste tipo de mastite (RIOLLET; RAINARD; POUTREL, 2001).

2.5.2.2 IL-4

A Interleucina 4 (IL-4) é uma citocina pertencente a família das hematopoetinas, produzida principalmente pelos linfócitos Th2 e mastócitos, e em menores quantidades pelas células Th1 (LE et al., 1988). A atividade principal da IL-4 é determinar o perfil da resposta imune em Th2, portanto entre suas funções efetoras, destacam-se a ativação das células B e o aumento da expressão de moléculas de MHC classe II. Nas células B ativadas estimula a síntese de IgE e IgG1, sendo seu efeito antagonizado por IFN-γ (LE et al., 1988). O controle e ativação de eosinófilos e mastócitos também encontra-se entre as funções desta

citocina (LE et al., 1988; ELSE; FINKELMAN, 1998; JANEWAY et al., 2002; WALDVOGEL et al., 2004).

É típica das respostas Th2, e normalmente associada à alergia e estados parasitários, principalmente em infecções por nematoides gastrintestinais (ZAROS; VIEIRA, 2008).

2.5.2.3 IL-10

A IL-10, uma importante citocina imunossupressora, é produzida principalmente por células T CD8+ ativadas o que proporciona a estas células uma denominação alternativa de células T regulatórias (O'SHEA; MA; LIPSKY, 2002). Células Th0, Th1, Th2 ativadas, linfócitos B, mastócitos e monócitos ativados por LPS também podem produzir IL-10, sendo todas elas fontes menos importantes desta citocina. Sua síntese pode ser inibida pela IL-4 e também de maneira autócrina pela própria IL-10 (VARELLA; FORTES, 2001).

Como principais efeitos a IL-10 está correlacionada à inibição da síntese de outras citocinas, principalmente pró-inflamatórias, como o IFN-γ, IL-2, IL-12, TNF-β. Tal fato resulta no controle das respostas imunes excessivas a infecções, reduzindo assim o estabelecimento de possíveis doenças imunes (HARTOG et al., 2011). Atua na indução de tolerância e na regulação imune tanto nas repostas inatas como nas adaptativas inibindo a proliferação de células Th1, mas não de Th2, diminuindo a função citolítica e secretória dos linfócitos Th1 e facilitando o desenvolvimento de resposta Th2. A IL-10 pode também atuar como um fator de co-estimulação para a proliferação de mastócitos e crescimento de timócitos imaturos, agindo como fator de diferenciação para as células T citotóxicas (THOMPSON-SNIPES et al., 1991; HARTOG et al., 2011).

Inibe células dendríticas residentes nos linfonodos, e ainda induz tolerância nestas células. Células apresentadoras de antígenos expostas a IL-10 ocasionam falhas na indução da produção de IFN-γ pelos linfócitos Th1 (HARTOG et al., 2011).

Em pacientes humanos com sepse, o aumento da IL-10 sérica está associado com prognósticos mais pobres e aumento no risco de falência múltipla de órgãos e morte (MONNERET; FINCK; VENET, 2004).

2.5.2.4 IFN-γ

Interferons são um grupo de glicoproteínas que foram originalmente identificadas com base em sua atividade antiviral, mas que possuem muitas outras funções. Estes chamados "efeitos não antivirais" foram sugeridos a partir da identificação de suas funções imunoregulatórias envolvendo tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa (TAYAL; KALRA, 2008).

As IFNs do tipo 1 (IFN-α e IFN-β) induzem atividades antiproliferativas e antivirais enquanto que os IFNs do tipo 2 (IFN-γ) apresentam menor atividade antiviral porém propriedades imunomodulatórias mais potentes (TAYAL; KALRA, 2008).

As IFN-α e IFN-β são produzidas por monócitos, macrófagos, células linfoblásticas, fibroblastos e células infectadas por vírus (BORDEN, 1992). Já a IFN-γ é produzido por muitas células do sistema imune inato e adaptativo incluindo células NK, linfócitos T CD4+ e T CD8+ (COLTMAN et al., 2001; TAYAL; KALRA, 2008; WACK; OPENSHAW; O'GARRA, 2011).

As IFN exercem seus efeitos através da ligação a receptores heterodiméricos de membrana formados por duas cadeias IFN-R1 e IFN-R2, que iniciam uma série de eventos de sinalização intracelular. O acionamento das Janus kinases (Jaks) sinalizam a transdução e ativação da transcrição da STAT que aciona a via de sinalização que conduz a ativação transcripcional de genes (TAYAL; KALRA, 2008; WACK; OPENSHAW; O'GARRA, 2011).

Interferons (IFN) possuem várias atividades biológicas, incluindo não apenas as ações antivirais como citado anteriormente, mas também a inibição do crescimento e proliferação celular, a regulação de genes específicos, a modulação da diferenciação celular e ativação de vários outros tipos celulares no sistema imune (MURAKAMI et al., 2004).

O papel das IFNs nas respostas imunes contra as infecções virais já parece bem estabelecido e sabe-se que ocorre sem que haja ação direta sobre os vírus ou mesmo inibição da adsorção do vírus na célula. Em vez disso, as IFNs bloqueiam a multiplicação viral pela inibição da habilidade transcricional dos ácidos nucleicos virais (COLTMAN et al., 2001; TAYAL; KALRA, 2008; WACK; OPENSHAW; O'GARRA, 2011).

Outro importante papel do IFN-γ pode ser visto no reforço da ativação da imunidade mediada por células atuando como fator de indução e modificação da imunidade por meio da inibição da proliferação de células que sintetizam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, indução da produção de MHC de classes I e II e diminuição da produção de algumas imunoglobulinas (DE MAEYER; DE MAEYER, 1992; SEM; LENGYEL, 1992; ZAROS; VIEIRA, 2008).

Nas glândulas mamárias bovinas normais a IFN-γ tem sido detectada por meio da técnica de RT-PCR, e alguns autores como Persson Waller et al. (2003) afirmam que as concentrações do IFN-γ comumente apresentam-se abaixo dos níveis de detecção por teste de ELISA.

Em estudo realizado com 96 amostras de soro lácteo de vacas Holandesas sadias Hagirawa, Domi e Ando (2008) encontraram níveis significativamente aumentados de IFN-γ no colostro de zero a três dias pós parto, expressados fortemente em células T CD8+, todavia sete dias após o parto, no leite considerado "maduro", os níveis de IFN-γ no soro lácteo foram baixos ou até mesmo indetectáveis.

A infusão de glândulas mamárias normais com IFN-γ recombinante bovina possui grande impacto na mobilização de mecanismos imunes específicos, principalmente na ativação e expansão clonal de células T e na produção de IL-2 (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DE ROSA, 1997).

Nas mastites por coliforme, por outro lado, os níveis de IFN-γ encontram-se significativamente aumentados durante o curso da infecção e a IFN-γ é encontrada no soro lácteo e sanguíneo de bovinos infectados (HISAEDA et al., 2001).

O tratamento com IFN-γ recombinante bovino de quartos mamários infectados experimentalmente com *E. coli* diminui a severidade da infecção pelo restrição do crescimento bacteriano e redução da resposta inflamatória por meio da inibição de

mediadores inflamatórios endógenos, particularmente do TNF-α nos quartos infectados (MOORE, 1996).

2.5.2.5 TNF-α

A família do fator de necrose tumoral está primariamente envolvida na regulação da proliferação e apoptose celular (TAYAL; KALRA, 2008).

O fator de necrose tumoral (TNF-α), uma importante citocina pró-inflamatória e multifuncional, foi originalmente descrito na década de 70 (VILCEK; FELDMANN, 2004). Produzido por células Th1 e algumas células Th2 o TNF-α pode atuar na resposta imune celular e humoral (JANEWAY et al., 2002). É também sintetizado por macrófagos sendo que monócitos, neutrófilos e células NK, após a estimulação por LPS, também possuem esta capacidade (VARELLA; FORTES, 2001).

Sua atividade é mediada por meio de dois funcionalmente diferentes receptores de superfície celular, TNF-R1 e TNF-R2. TNF-R1 está ligado as vias de sinalização associadas com a apoptose, enquanto que TNF-R2 pode induzir a transcrição de genes para sobrevivência, crescimento e diferenciação celular. Após sua transcrição o TNF-α é produzido como memTNF-α, o qual é clivado pela enzima conversora-TNF para gerar a forma solúvel da TNF-α. A forma solúvel da TNF-α liga-se preferencialmente ao TNF-R1, enquanto a memTNF-α preferencialmente liga-se ao TNF-R2 (MAC EWAN, 2002).

O TNF-α estimula a produção de colágeno, prostaglandinas, quimiocinas e citocinas, moléculas de adesão celular e fatores relacionados à reabsorção óssea (GONÇALVES et al., 2010). Desempenha papel na resposta imune, atua na proliferação e diferenciação celular, bem como na patogênese de muitas enfermidades humanas e animais, incluindo doenças autoimunes, inflamatórias, neuro-degenerativas, diabetes, choque séptico e insuficiência cárdica congestiva. Também exibem funções relacionadas à modulação da produção e ativação funcional de diversas outras citocinas (GUPTA et al., 2004; TAYAL; KALRA, 2008).

O TNF-α pode ainda induzir a migração de mastócitos para o local da infecção. Essa propriedade implica que esta citocina, juntamente com IL-4 e IL-8,

faça parte de um conjunto de quimiocinas que regulam a resposta migratória dos mastócitos nas inflamações mediadas por células Th1 e Th2 (OLSSON; TAUB; NILSSON, 2004).

Considerada por alguns autores como a principal citocina mediadora da inflamação aguda e da atividade plaquetária possui papel importante na gênese da febre, anemia e caquexia (TAYAL; KALRA, 2008). Em animais de laboratório, injeções de TNF, mesmo na ausência de bactérias, levam a quadro semelhante ao choque séptico, sugerindo uma importante ação deletéria quando sintetizado em quantidades excessivas (KUNKEL et al., 1991).

As demais ações do TNF são semelhantes às da IL-1. As alterações endoteliais, principalmente a perda da função de diminuição da coagulação, a atividade quimiotática e estímulo ao metabolismo oxidativo de fagócitos são ações do TNF compartilhadas com a IL-1. Esta citocina também apresenta a capacidade de aumentar a expressão de MHC de classe I e II (TARTAGLIA et al., 1993).

O fator de necrose tumoral-α (TNF-α) tem sido detectado e monitorado em glândulas mamárias bovinas infectadas e sadias. Elevados níveis de TNF-α podem demonstrar seu papel indispensável na manutenção e regulação das funções imunológicas das células e fatores envolvidos nas mudanças fisiológicas da glândula mamária (SORDILLO; SHAFER-WEAVER; DE ROSA, 1997).

A infusão da glândula mamária normal com TNF-α demonstra uma supressão reversível da função lactogênica das glândulas e enfraquece a barreira leite-sangue com efeito transitório nas respostas inflamatórias sistêmicas. Além disso tais infusões promovem ainda o aumento do influxo de neutrófilos para a glândula mamária e diminuição das concentrações de certas proteínas do leite como a α-lactoalbumina e a β-lactoalbumina (WATANABI et al., 2000).

Nas mastites naturais por coliformes infecções experimentais por *E. coli* e glândulas mamárias infundidas com LPS, o TNF-α encontra-se significativamente aumentado no leite e no soro. No soro, o nível de TNF-α é apenas extensivamente elevado nos casos clínicos severos de mastite por coliforme (HISAEDA et al., 2001).

Enterotoxinas de *S. aureus* estimulam células T na liberação de TNF-α e ou citocinas como a IL-2 e o IFN-γ (ALLUWAIMI, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo avaliar concentrações de citocinas no soro sanguíneo e lácteo de vacas naturalmente infectadas pelo VLB, nas diferentes formas de apresentação desta enfermidade.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Quantificar as concentrações das citocinas IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ no sangue periférico e soro lácteo obtido de fêmeas bovinas naturalmente infectadas pelo VLB, alinfocitóticas e manifestando linfocitose persistente.

b. Quantificar as concentrações de IL-10 no soro lácteo de fêmeas bovinas naturalmente infectadas pelo VLB manifestando linfocitose persistente.

c. Verificar possíveis inter-relações entre as concentrações de citocinas no sangue e no leite destes animais.

d. Analisar se as diferenças encontradas entre as concentrações séricas e lácteas das citocinas estudadas são influenciadas pela ação do VLB em cada um dos grupos experimentais.

CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DAS CITOCINAS IL-1β, IL-4, TNF-α E IFN-γ NO SANGUE E NO LEITE DE VACAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS.

4 INTRODUÇÃO

O vírus da leucemia bovina (VLB), um membro da família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae* e gênero *Deltaretrovirus*, é o agente etiológico da Leucose enzoótica dos bovinos (LEB), uma doença infectocontagiosa crônica, com ampla distribuição geográfica, que acomete os bovinos, comprometendo particularmente o tecido linfóide destes animais (FAUQUET et al., 2004; ASADPOUR; JAFARI, 2010).

Diferentes perfis na produção de citocinas ocorrem de acordo com o patógeno envolvido e podem muitas vezes determinar o curso da doença, uma vez que distúrbios no equilíbrio da produção e liberação destas proteínas têm papel significativo no desencadeamento e agravamento de diversas enfermidades (RIOLLET; RAINARD; POUTREL, 2000; VARELLA; FORTES, 2001).

Muitos dos bovinos infectados pelo VLB são assintomáticos, todavia aproximadamente um terço destes podem apresentar linfocitose persistente (LP), caracterizada pela expansão policlonal não maligna de linfócitos B, e de 0,1 a 10% destes podem desenvolver as formas tumorais associadas à doença (SCHWARTZ; LEVY, 1994).

Sabe-se que os vírus são capazes de interferir com as funções das citocinas em vários níveis: podem inibir sua síntese ou processamento, bloquear sua ligação a receptores celulares do hospedeiro, interromper eventos celulares iniciados após sua ligação com receptores específicos e influenciar na natureza da resposta imune do hospedeiro (Th1 ou Th2) (SMITH, 1996).

Pode-se dizer, enfim, que dados como estes sugerem que a patogênese da leucose enzoótica dos bovinos dá-se não só pela propagação do vírus, mas também, por mudanças em fatores do hospedeiro, como a resposta imune e em causa ou consequência o microambiente formado pelas citocinas.

Diversos autores defendem que possíveis desbalanceamentos desta rede de citocinas possam ser responsáveis pela ineficiência na eliminação viral podendo inclusive, levar a cronificação de processos ou até mesmo a graves lesões no hospedeiro quando a ação destas citocinas é qualitativamente fraca (PETERSON et al., 2004).

Associa-se a estas condições a presença de partículas virais, bem como, de seus efeitos deletérios sobre a produção e saúde da glândula mamária pela possível relação entre a infecção pelo VLB e a susceptibilidade destes animais a mastite (RINALDI; LI; CAPUCO, 2010).

Com base neste cenário alicerçasse a hipótese de que diferenças no microambiente de citocinas moduladas em função da resposta imune ao VLB possam ser responsáveis pela progressão desta enfermidade em suas variadas formas de apresentação.

Com o intuito de verificar tal condição objetivou-se a quantificação das concentrações das citocinas IL-1β, IL-4, IFN-γ e TNF-α no soro sanguíneo e lácteo de vacas naturalmente infectadas pelo VLB em suas diferentes formas de apresentação, minimizados outros aspectos de estimulação induzida do sistema imunológico que não fosse a presença do próprio vírus *in vivo.*

5 MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução do presente estudo, as mensurações das concentrações de citocinas foram precedidas por fase de triagem dos animais e divisão dos grupos experimentais conforme descrito a seguir.

5.1 ANIMAIS UTILIZADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi dividido em duas fases. Durante a primeira fase foi realizada triagem de 194 vacas da raça Holandesa, mantidas em sistema de produção conforme as exigências para a produção de leite do tipo B, localizadas nos municípios de Tambaú – SP e Santa Rita do Passa Quatro – SP. Estes animais foram avaliados quanto a presença de infecção pelo VLB e classificados com base nos resultados de hemogramas seriados, de acordo com Kettmann et al. (1987), em:

a. Vacas negativas no sorodiagnóstico de leucose enzoótica dos bovinos (Grupo N);
b. Vacas sororreagentes para leucose enzoótica dos bovinos e sem linfocitose persistente (Grupo AL);
c. Vacas sororreagentes para leucose enzoótica dos bovinos com linfocitose persistente (Grupo LP).

Foram realizados testes de avaliação do úbere “ao pé da vaca” (avaliação física do úbere e tetos, teste de Tamis e *California mastitis test*) de cada um dos animais pertencentes aos grupos experimentais, e, subsequentemente, amostras de leite foram colhidas e submetidas à contagem de células somáticas e exame bacteriológico.

Considerou-se como critérios de inclusão amostral a ausência de alterações ao exame físico do úbere, e demais testes apontados acima, ausência de tetos

afuncionais ou antecedentes de tratamento para mastite por no mínimo 30 dias, contagem de células somáticas ≤ 250.000 cél/mL, resultado negativo no exame bacteriológico do leite e estabilidade do perfil hematológico.

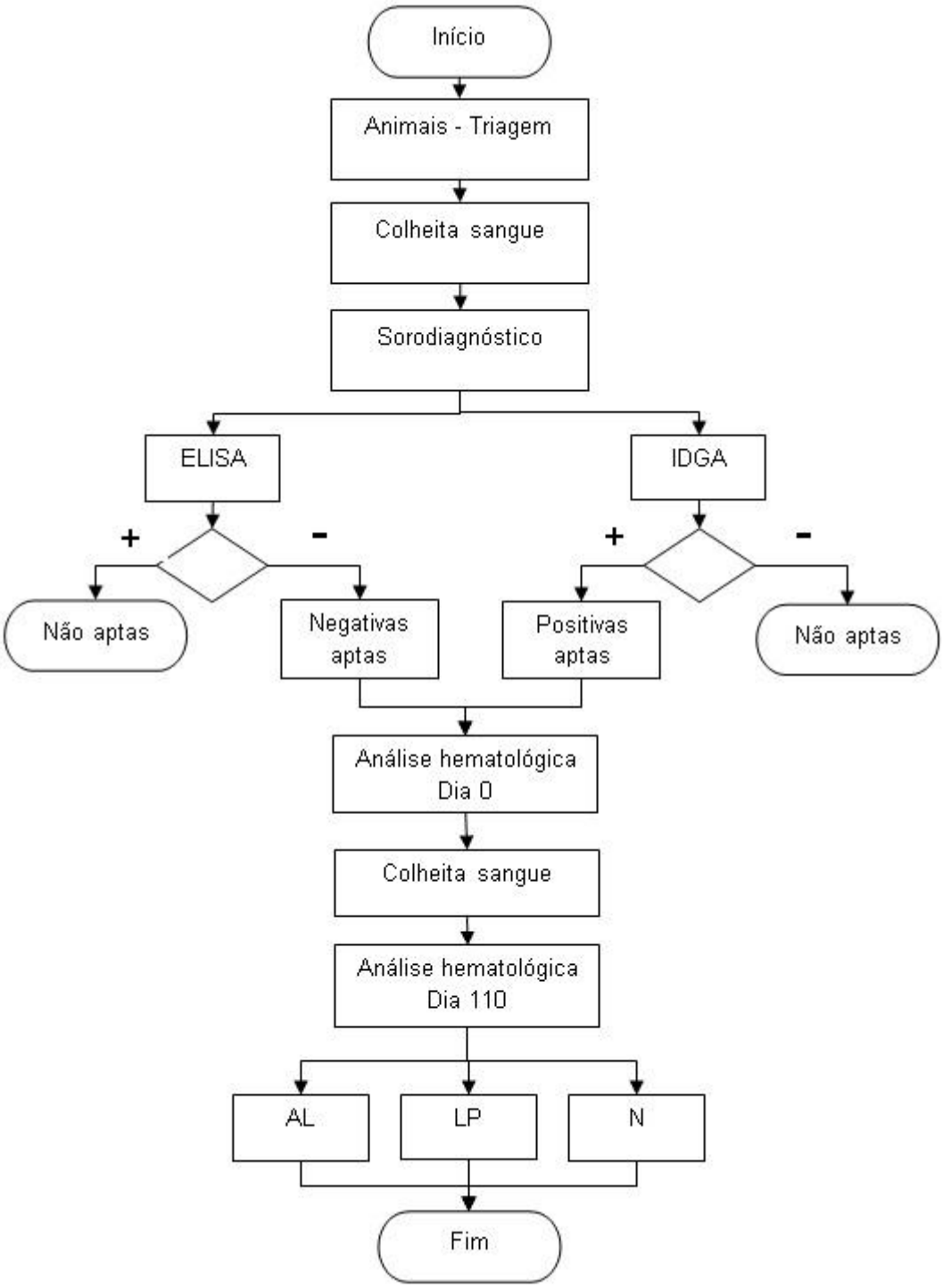
Na segunda fase, os animais selecionados para cada um dos grupos experimentais tiveram suas amostras de sangue e leite avaliadas para a concentração de citocinas IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ.

5.2 PRIMEIRA FASE

O presente estudo teve sua primeira fase, ou fase de triagem, caracterizada pela avaliação dos parâmetros hematológicos e lácteos necessários a verificação dos critérios de inclusão amostral e definição dos grupos experimentais.

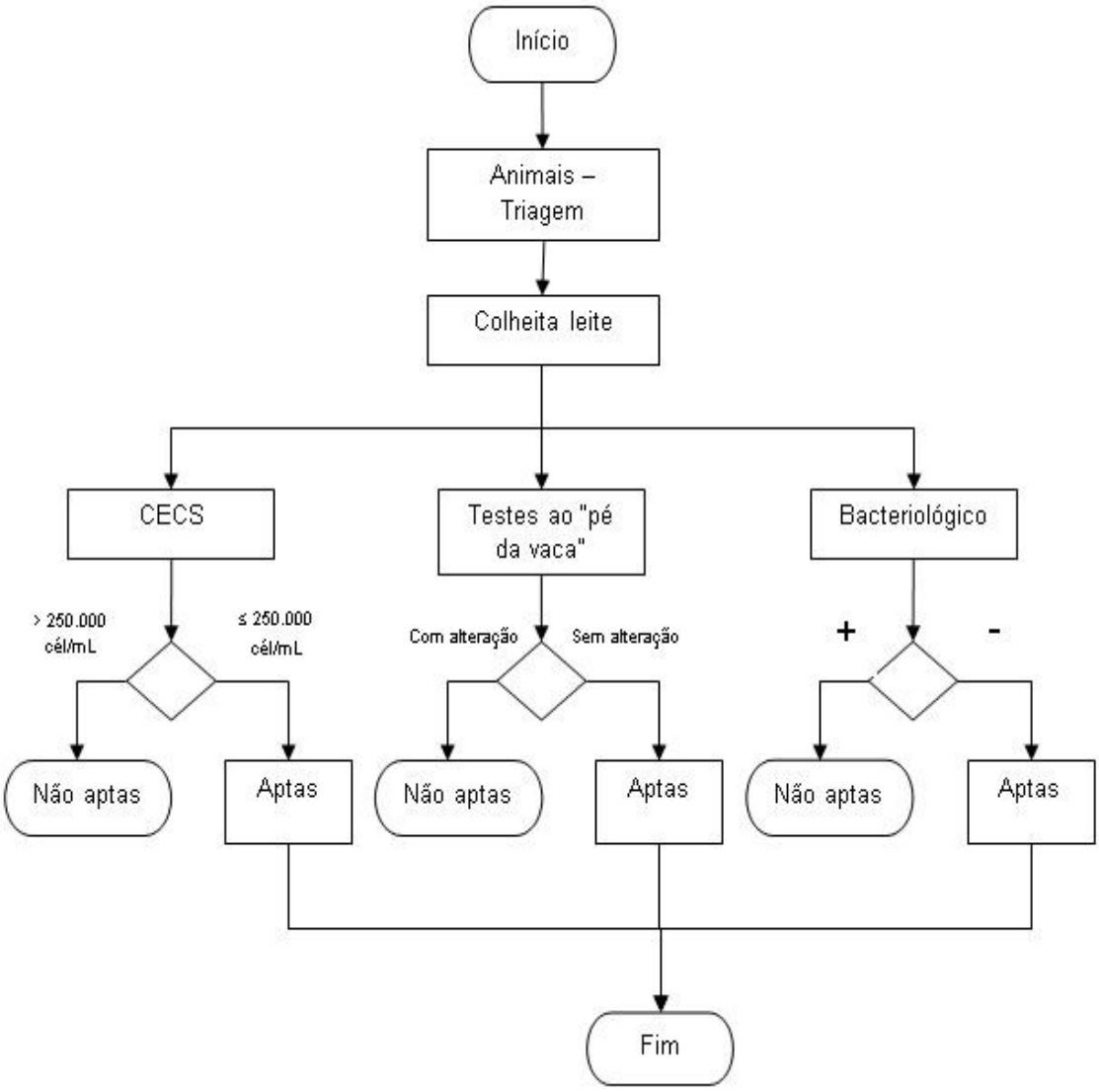
As figuras 3 e 4 expostas abaixo apresentam uma representação esquemática do processo de seleção dos animais bem como da construção dos grupos experimentais sob o ponto de vista hematológico e lácteo, respectivamente.

Figura 3 – Representação esquemática das etapas de triagem e formação dos grupos experimentais correlacionadas às amostras de sangue – São Paulo – 2012



N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Figura 4 – Representação esquemática das etapas de triagem e formação dos grupos experimentais correlacionados ao úbere e amostras de leite – São Paulo – 2012



5.2.1 Colheita de sangue

Foram colhidas de cada um dos animais duas amostras de sangue utilizando sistema a vácuo[2], por venopunção coccígea sendo uma em tubo siliconizado, sem anticoagulante, com capacidade para até 10mL (obtenção de soro), e outra em tubo

[2] Sistema Vacutainer® - Becton Dickinson™, San Diego, CA.

siliconizado contendo EDTA[3] dipotássico, com capacidade para até 4mL para a realização de hemograma.

Após aproximadamente 110 dias da primeira colheita, novas amostras de sangue foram colhidas para a verificação da normalidade no hemograma e alocação das vacas dos grupos N, AL e LP, para tanto foram considerados, como referência para as contagens leucocitárias dos animais, os valores apontados por Kramer et al. (2000) e Divers e Peek (2008) sumarizados na tabela 1.

Tabela 1 – Valores do leucograma de bovinos sadios, em número absoluto e contagem diferencial relativa, utilizados como referência neste estudo – São Paulo – 2012

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

Fonte: Kramer et al. (2000); Divers e Peek (2008).

5.2.2 Sorodiagnóstico para leucose enzoótica dos bovinos

O genoma completo do VLB consiste em uma sequencia de 8.714 nucleotídeos e pode ser definida como 5'LTR-*gag*-*pol*-*env*-px-LTR 3'. O gene *gag* é altamente conservado e consiste em uma sequencia de 1.178 nucleotídeos. Ogene *env* do VLB (composto por 1.493 nucleotídeos) codifica um percurssor proteico (gp72), o qual é clivado em gp51, uma proteína imunodominante que serve como alvo para anticorpos neutralizantes e em gp30 uma proteína transmembrana que será responsável pela entrada do vírus na célula (ALKAN et al., 2011)

Para a detecção dos anticorpos séricos específicos anti-VLB, foi empregada a técnica de Imunodifusão Radial Dupla de *Ouchterlony*[4] (Imunodifusão em Ágar gel –

[3] *Ethylenediamine tetraacetic acid* – ácido etilenodiamino tetra-acético

IDGA) e Kits comerciais[5] de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando o antígeno glicoprotéico (gp51) extraído do envelope do vírus.

Foram consideradas vacas positivas para LEB, aquelas diagnosticadas como sororreagentes no teste de IDGA (de maior especificidade), e negativas, aquelas apresentando diagnostico negativo no teste ELISA (de maior sensibilidade).

5.2.3 Análise hematológica

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

5.2.4 Colheita de leite

Após a realização do exame físico da glândula mamária acrescido da realização do exame da caneca de fundo escuro e do *California mastitis test* (CMT), as amostras de leite foram colhidas em duas alíquotas. A primeira foi destinada a contagem eletrônica de células somáticas (CECS) e a segunda para o exame bacteriológico.

---

[4] Kit comercial contendo antígeno para diagnóstico de Leucose enzoótica dos bovinos – Laboratório TECPAR, Curitiba, PR.

[5] Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit® - VRMD, INc., Pulman, WA, USA, n° cat. 284-5.

5.2.5 Testes ao “pé da vaca”

A avaliação clínica dos animais foi realizada por meio do exame físico da glândula mamária e do exame do leite conforme Birgel (2004). Todos os quartos mamários foram avaliados por inspeção do úbere e dos tetos e palpação do parênquima, tetos e estruturas internas. Animais que apresentaram qualquer tipo de alteração nesta avaliação foram considerados não aptos à formação dos grupos experimentais.

O leite foi avaliado imediatamente antes da colheita das amostras pelo teste de Tamis e CMT. O úbere foi higienizado por meio da imersão de cada teto em solução antisséptica e a secagem foi realizada com papel toalha individual. Após esta higienização foi realizado o teste deTamis (DIRKSEN; GRUNDER; STOBER, 1993), observando-se cor, consistência e presença de massa ou grumos. Em seguida foi realizado o teste de CMT, utilizando detergente comercial específico[6] para este teste (2 mL do reagente em 2 mL de leite), observando-se a intensidade da reação (aumento da viscosidade da mistura leite e reagente) e variações do pH (SCHALM; NOORLANDER, 1957). Neste caso também os animais que apresentaram qualquer tipo de alteração na avaliação dos testes foram considerados não aptos à formação dos grupos experimentais.

5.2.6 Contagem eletrônica de células somáticas (CECS)

As amostras de leite encaminhadas para a CECS foram colhidas em frascos, com capacidade de 50 mL, contendo o conservante Bronopol. O material foi acondicionado em caixas e enviado para análise no Laboratório de Fisiologia da Lactação do Departamento de Fisiologia do Centro de Tecnologia para o

---

[6] Reativo específico, marca: Fatec®

Gerenciamento da Pecuária de Leite da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), Piracicaba – SP.

Conforme descrito anteriormente os animais que apresentaram contagem de células somáticas ≥ 250.000cél/mL em qualquer uma das quatro glândulas mamárias foram consideradas não aptos à formação dos grupos experimentais.

5.2.7 Exame bacteriológico

Para o exame bacteriológico foi realizada a antissepsia do teto de acordo com o *National Mastitis Council* (OLIVER et al., 2004). As amostras de leite foram acondicionadas, em frascos estéreis específicos, sob refrigeração até a chegada no laboratório.

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

No laboratório, as amostras de leite foram congeladas para posteriormente serem semeadas em placas de *Petri* contendo meio de ágar-sangue de carneiro (ágar base[7] acrescido de 7% de sangue de carneiro) e ágar *Sabourand-dextrose*[8] e incubadas (37°C por 24 e 72 horas) (BAUER et al., 1966). Para as amostras de leite com crescimento bacteriano foi feita a identificação das bactérias por meio de provas bioquímicas (LENNETE; BALOWS; HANSLER, 1985), seguida da classificação estabelecida por Krieg e Holt (1994) e Murray et al. (1999).

Somente os animais que apresentaram cultura negativa para as quatro glândulas mamárias foram considerados aptos a formação dos grupos experimentais.

---

[7] Blood agar base – Oxoid Hampshire – U.K.

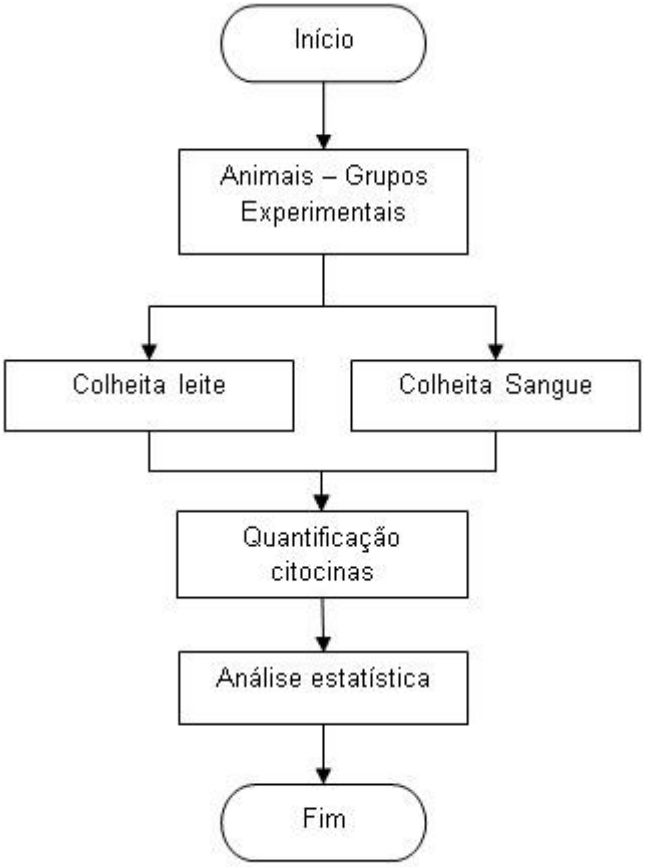
[8] Sabourand dextrose Agar – Oxoid Hampshire – U.K.

5.3 SEGUNDA FASE

Para a segunda fase deste experimento foram selecionadas quatro vacas do grupo negativo, três vacas do grupo AL e quatro vacas do grupo LP. Nesta fase foram avaliadas as amostras de sangue e de leite de cada um dos animais para a quantificação do perfil de citocinas dos onze animais selecionados.

A figura 5 apresenta representação esquemática do experimento.

Figura 5 – Representação esquemática da etapa de avaliação das concentrações de citocinas lácteas e séricas – São Paulo – 2012



5.3.1 Colheita de sangue

Foram colhidas de cada vaca, três amostras de sangue, sendo duas em tubo sem anticoagulante para a confirmação do sorodiagnóstico da LEB e separação do soro para posterior quantificação das citocinas séricas e outra em tubo com EDTA dipotássico para a realização de hemograma (mesmos procedimentos descritos nos itens 5.2.2 e 5.2.3).

5.3.1.1 Quantificação de citocinas

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos e o soros obtidos a partir desta foram congelados em tubos do tipo *eppendorf*[9] e armazenados a -40º C até o momento da realização dos testes.

Para a determinação das quantidades séricas das citocinas IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ nas amostras obtidas dos animais dos diferentes grupos experimentais foram utilizados kits comerciais de ELISA seguindo os protocolos e determinações dos fabricantes (*Interleukin-1 Beta Human, Biotrack Easy System*[10]*; Bovine Interleukin-4 Screening Set*[11]*; TNF-α Human, Biotrack Easy ELISA Kit*[12]; IFNγ *Human, Biotrack ELISA System*[13]).

---

[9] Eppendorf microtube 3810

[10] GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA; n°. code RPN2751

[11] Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA; n°. code ESS00331

[12] GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA; n°. code RPN5967

[13] GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA; n° code RPN2787

5.3.2 Colheita de leite

Após as avaliações da glândula mamária acrescidas do exame do próprio leite (BIRGEL, 2004) foram coletados 50 mL de leite em frascos de plástico estéril por glândula mamária de cada um dos animais inclusos nos grupos experimentais.

5.3.2.1 Quantificação de citocinas

As amostras de soro lácteo foram obtidas por meio de centrifugação do leite a 1.500 rpm por 10 minutos. Em seguida a camada de gordura formada foi removida e o soro lácteo armazenado em tubos tipo *eppendorf*[14] a -80º C até o momento do descongelamento e quantificação das citocinas (KOESS; HAMANN, 2008).

Para a determinação das quantidades lácteas das citocinas IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ nas amostras obtidas dos animais dos diferentes grupos experimentais foram utilizados kits comerciais de ELISA seguindo os protocolos e determinações dos fabricantes (*Interleukin-1 Beta Human, Biotrack Easy System*[15]*; Bovine Interleukin-4 Screening Set*[16]*; TNF-α Human, Biotrack Easy ELISA Kit*[17]*;* IFNγ *Human, Biotrack ELISA System*[18]).

---

[14] Eppendorf microtube 3810

[15] GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA; n°. code RPN2751

[16] Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA; n°. code ESS00331

[17] GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA; n°. code RPN5967

[18] GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA; n°. code RPN2787

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises das variáveis quantitativas são apresentadas em tabelas com média, mediana, desvio-padrão, valor mínimo e máximo e P-valor. Para as comparações entre os grupos utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar se existe pelo menos um grupo diferente dos demais. Nos casos em que estes apresentaram-se significativos foi utilizado “pós-teste” para verificar onde ocorreu tal diferença.

O nível de significância aplicado nos testes foi de 5% ($P \leq 0,05$), sempre considerando hipóteses alternativas bicaudais.

Para tais análises, foi utilizado o *software* estatístico SPSS®, versão 18[19].

[19] SPSS® – IBM™, Chicago, IL, USA

6 RESULTADOS

Os resultados das análises das amostras tanto do sangue quanto do leite são aqui apresentados em duas etapas. Na primeira etapa estão expostos os resultados descritivos das análises de toda a população submetida aos critérios de inclusão amostral para a composição dos grupos experimentais. Na segunda etapa estão apresentados os resultados das quantificações do perfil de citocinas no sangue e no leite dos animais selecionados e inclusos em cada um dos grupos experimentais.

6.1 ANÁLISE DESCRITIVA

Conforme apresentado no delineamento para composição dos grupos experimentais as vacas foram submetidas a etapa de triagem e os resultados obtidos seguem abaixo.

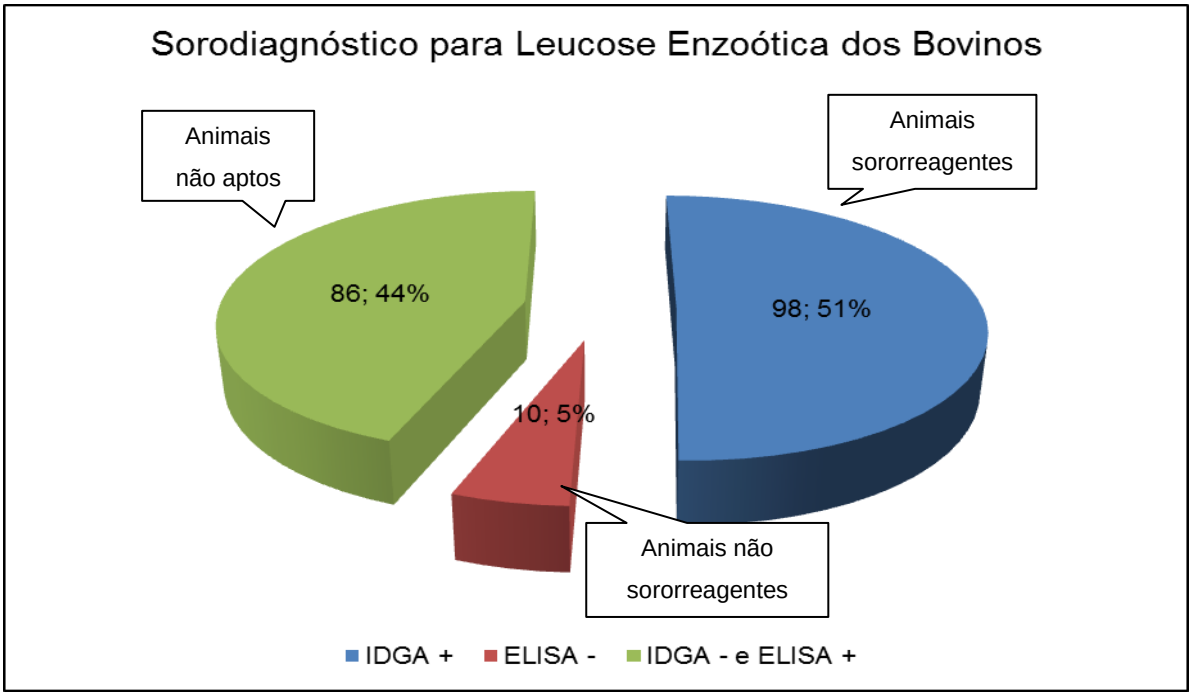
6.1.1 Triagem

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

Das 194 vacas, 98 (50,50%) foram positivas e dez (5,20%) foram negativas para a pesquisa de anticorpos anti-gp51 do VLB nos testes de ELISA e IDGA. As 86 (44,30%) vacas restantes não atenderam ao critério de inclusão amostral quanto ao sorodiagnóstico, apresentando-se negativas na IDGA e/ou positivas no ELISA.

A distribuição populacional da amostra com base no sorodiagnóstico para a LEB apontada acima encontra-se representada no gráfico 1.

Gráfico 1 – Distribuição dos animais avaliados durante o período de triagem de acordo com os resultados no sorodiagnóstico para leucose enzoótica dos bovinos – São Paulo – 2012



Com o objetivo de identificar as vacas positivas ao VLB que apresentaram linfocitose persistente e de confirmar a não sororreatividade e a normalidade do hemograma das demais vacas, após 110 dias da colheita inicial das amostras de sangue foi realizada uma segunda triagem. Foram consideradas vacas com LP aquelas com contagem total de linfócitos superior a 10 x 10^3/µL e a contagem de leucócitos superior a 15 x 10^3/µL conforme critérios estabelecidos por Brenner, Avidar e Lahav, (2007). A divisão dos animais triados para este estudo segundo os critérios apontados por Brenner, Avidar e Lahav (2007) encontra-se representada no gráfico 2.

Os valores das médias, dos desvios padrão, das medianas e dos valores mínimo e máximo, absolutos e relativos dos leucócitos e dos linfócitos das amostras negativas e positivas para a LEB obtidas no primeiro e segundo hemograma estão expressos na tabela 2 abaixo.

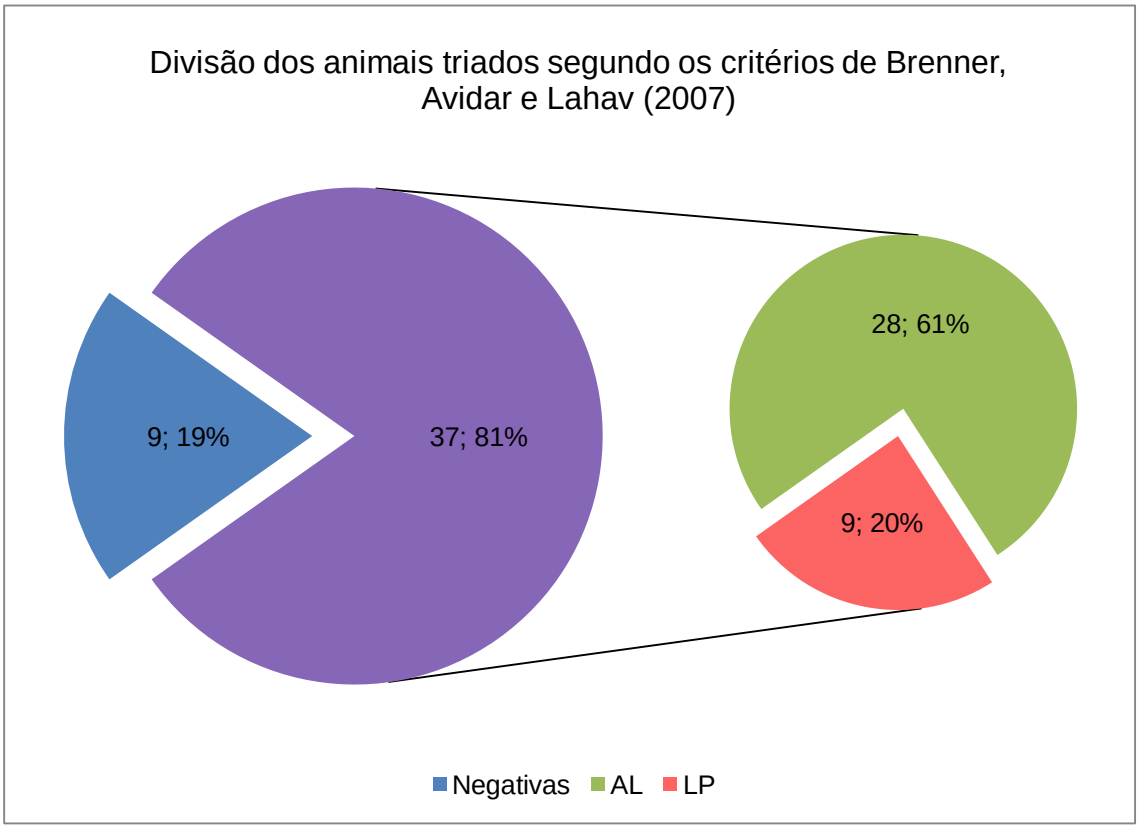
Tabela 2 – Valores das médias, medianas, desvios-padrões, mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e linfócitos das amostras de sangue dos animais triados durante o estudo – São Paulo – 2012

				Grupos	
				Negativo	Positivo
Primeira triagem	Valores absolutos	Leucócitos (x10³)/µL	Média	11,38	14,71
			Desvio Padrão	(±2,49)	(±7,40)
			Mediana	11,85	13,00
			(Mínimo - Máximo)	(6,90 - 15,40)	(4,10 - 49,30)
		Linfócitos (x10³)/µL	Média	7,00	10,01
			Desvio Padrão	(±2,24)	(±6,64)
			Mediana	6,78	8,52
			(Mínimo - Máximo)	(4,65 - 12,16)	(2,05 - 41,41)
	Valores relativos	Linfócitos (%)	Média	59,20	61,76
			Desvio Padrão	(± 13,24)	(±13,65)
			Mediana	61,00	63,50
			(Mínimo - Máximo)	(38,00 - 75,00)	(24,00 - 85,00)
		Linfócitos atípicos (%)	Média	2,60	3,22
			Desvio Padrão	(±1,89)	(±2,19)
			Mediana	2,50	3,00
			(Mínimo - Máximo)	(0,00 - 5,00)	(0,00 - 10,00)
Total de amostras de sangue				10	98

				N	AL	LP
Segunda Triagem	Valores absolutos	Leucócitos (x10³)/µL	Média	9,14	9,27	22,48
			Desvio Padrão	(±2,12)	(±2,02)	(±3,75)
			Mediana	9,00	9,65	21,10
			(Mínimo - Máximo)	(5,40 - 13,10)	(4,30 - 12,10)	(17,40 - 29,00)
		Linfócitos (x10³)/µL	Média	5,72	5,67	16,82
			Desvio Padrão	(±1,43)	(±1,90)	(±4,05)
			Mediana	5,31	5,68	16,28
			(Mínimo - Máximo)	(3,51 - 8,64)	(1,93 - 10,28)	(10,71 - 24,94)
	Valores relativos	Linfócitos (%)	Média	60,11	57,25	61,98
			Desvio Padrão	(± 10,06)	(±11,69)	(±26,93)
			Mediana	61,00	56,50	76,00
			(Mínimo - Máximo)	(44,00 - 76,00)	(29,00 - 83,00)	(0,78 - 79,00)
		Linfócitos atípicos (%)	Média	3,00	3,14	4,67
			Desvio Padrão	(±2,12)	(±2,01)	(±3,00)
			Mediana	3,00	3,00	6,00
			(Mínimo - Máximo)	(0,00 - 7,00)	(0,00 - 7,00)	(0,00 - 8,00)
Total de amostras de sangue				9	28	9

N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Gráfico 2 – Divisão dos animais triados de acordo com os grupos experimentais definidos – São Paulo – 2012

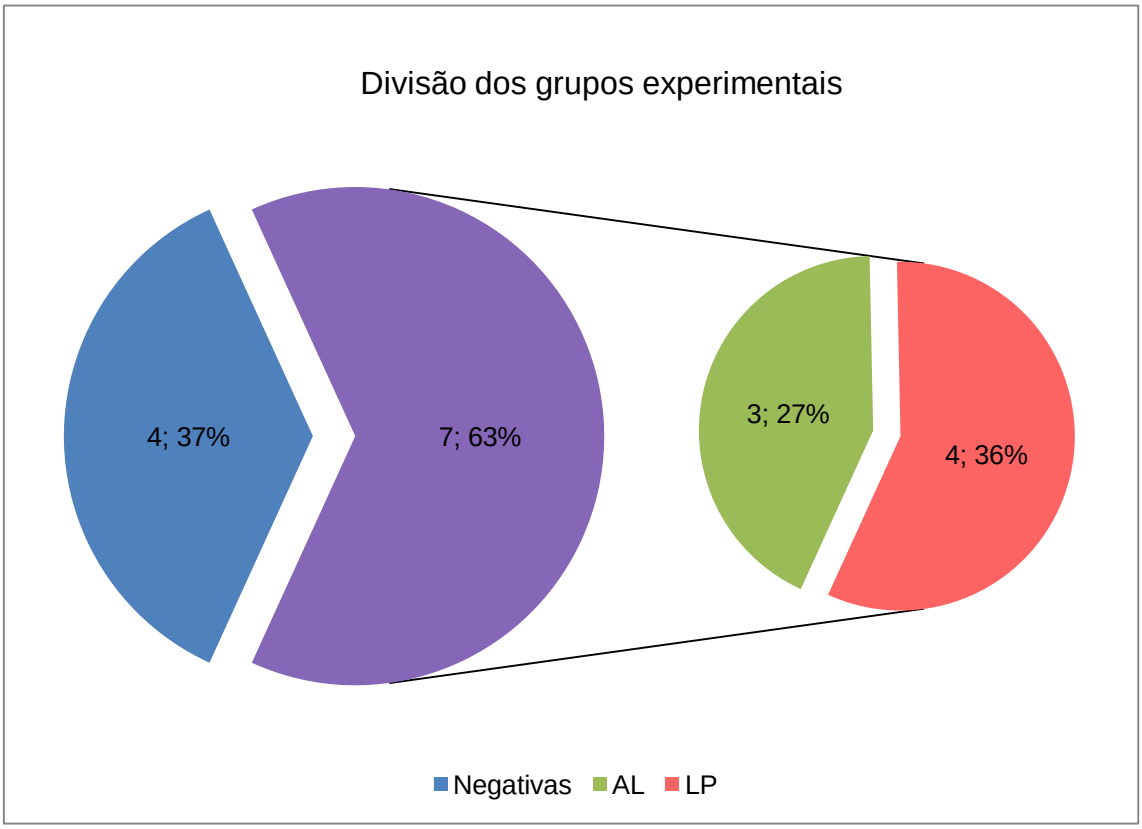


N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

6.1.2.1 Amostras de sangue

Atendidos os critérios de inclusão amostral, onze vacas foram selecionadas e alocadas nos respectivos grupos, a saber: quatro vacas negativas na pesquisa de anticorpos para o VLB (Grupo N); três vacas sororreagentes e sem linfocitose (Grupo AL) e quatro vacas sororreagentes e manifestando linfocitose persistente (Grupo LP), como pode ser visto no gráfico 3.

Gráfico 3 – Divisão dos animais triados de acordo com os grupos experimentais definidos para este estudo – São Paulo – 2012



N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

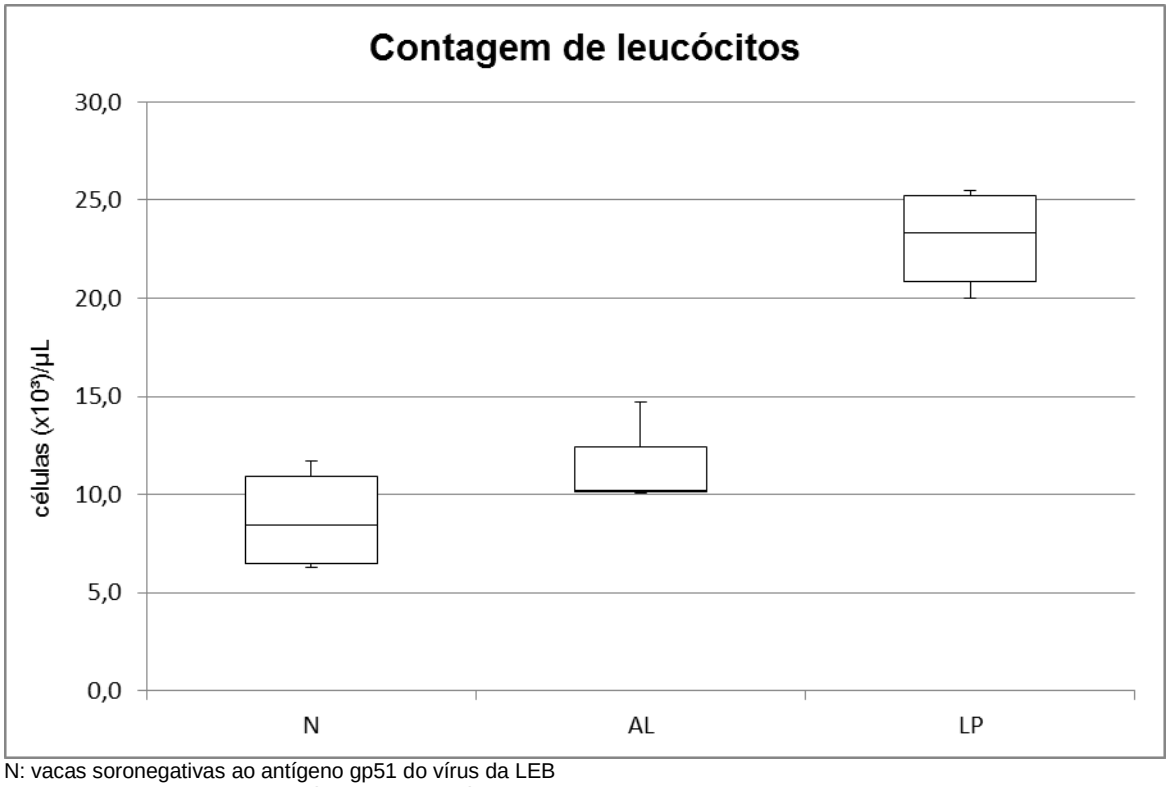
Os valores das médias, desvios-padrão, medianas e dos valores mínimos e máximos absolutos e relativos dos leucócitos e dos linfócitos das amostras de sangue das vacas utilizadas no experimento estão descritas na tabela 3. O gráfico 4 demonstra os valores citados na tabela 3 quanto aos leucócitos divididos com base nos grupos experimentais.

Tabela 3 – Valores das médias, medianas, desvios-padrão, mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e linfócitos das amostras de sangue das vacas utilizadas no experimento – São Paulo – 2012

			Grupos		
			N	AL	LP
Valores absolutos	Leucócitos (x10³)/µL	Média	8,73	11,67	23,05
		Desvio Padrão	(±2,65)	(±2,63)	(±2,64)
		Mediana	8,45	10,20	23,35
		(Mínimo - Máximo)	(6,30 - 11,70)	(10,10 - 14,70)	(20,00 - 25,50)
	Linfócitos (x10³)/µL	Média	4,63	5,71	17,09
		Desvio Padrão	(±0,94)	(±7,07)	(±3,16)
		Mediana	4,40	8,53	17,18
		(Mínimo - Máximo)	(3,75 - 5,97)	(5,71 - 8,53)	(14,11 - 19,89)
Valores relativos	Linfócitos (%)	Média	52,25	52,33	61,00
		Desvio Padrão	(±10,59)	(±11,50)	(±14,31)
		Mediana	51,00	52,00	60,00
		(Mínimo - Máximo)	(41,00 - 66,00)	(41,00 - 64,00)	(46,00 - 78,00)
	Linfócitos atípicos (%)	Média	2,75	9,00	12,75
		Desvio Padrão	(±0,96)	(±5,20)	(±11,87)
		Mediana	2,50	6,00	12,50
		(Mínimo - Máximo)	(2,00 - 4,00)	(6,00 - 15,00)	(0,00 - 26,00)
Total de amostras de sangue			4	3	4

N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Gráfico 4 – Representação dos valores dos leucócitos das amostras de sangue das vacas utilizadas durante o experimento divididas de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012



N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Conforme demonstrado na tabela 4 e gráfico 4 as medianas dos leucócitos ($x10^3$)/µL foram 8,45 para o grupo negativo, 10,20 para o grupo AL e 23,35 para o grupo LP.

6.1.2.2 Amostras de leite

Conforme os critérios de inclusão amostral estabelecidos, todos os onze animais inclusos neste experimento apresentaram exame físico da glândula mamária com características compatíveis à úberes sadios e teste de Tamis, *California mastitis test* (CMT) e exame bacteriológico dentro dos padrões de normalidade para a espécie. A CECS foi realizada no Laboratório de Fisiologia da Lactação do Departamento de Fisiologia do Centro de Tecnologia para o Gerenciamento da

Pecuária de Leite da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), Piracicaba – SP e os resultados descritivos encontram-se na tabela 4 abaixo.

Tabela 4 – Resultados médios, medianos, desvios-padrão, mínimo e máximo (CCS/mL) das quantidades de células somáticas verificadas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2012

		Grupos		
		N	AL	LP
CCS	Média	37.125	72.166	44.583
	Desvio Padrão	(±42.456)	(±79.639)	(±61.600)
	Mediana	18.000	38.500	15.500
	(Mínimo - Máximo)	(2.000 - 131.000)	(1.000 - 139.000)	(1.000 - 208.000)
Total de amostras		16	12	16

N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

6.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS

6.2.1 Perfil sérico de citocinas

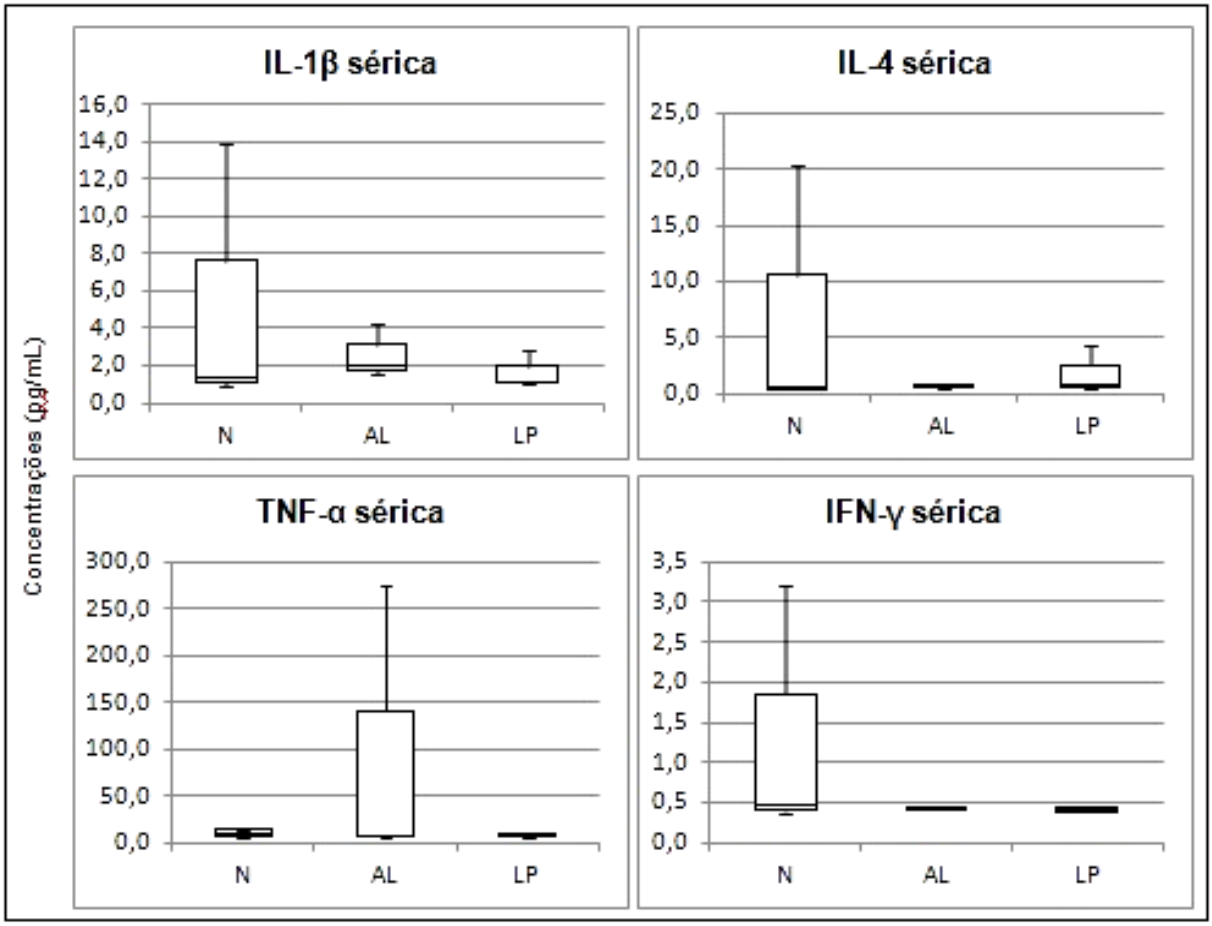
As concentrações séricas das citocinas IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ foram realizadas empregando-se kits comerciais para ELISA. Os resultados obtidos são apresentados na forma de média, mediana, desvios-padrão, valores mínimos e máximos e P-valor para cada grupo experimental na tabela 5 abaixo.

Tabela 5 – Resultados médios, mediana, desvio-padrão, mínimo, máximo (pg/mL) e valor de P das quantidades séricas de IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ verificadas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2012

		Grupos			P-valor
		Negativo	AL	LP	
IL-1β	Média	4,38	2,63	1,53	0,3126
	Desvio-padrão	(± 6,32)	(± 1,46)	(± 0,88)	
	Mediana	1,37ª	1,98ª	1,11ª	
	Mínimo – Máximo	(0,91 - 13,85)	(1,61 - 4,30)	(1,04 - 2,85)	
	n	4	3	4	
IL-4	Média	5,49	0,64	1,61	0,5197
	Desvio-padrão	(± 9,94)	(± 0,23)	(± 1,86)	
	Mediana	0,57ª	0,52ª	0,74ª	
	Mínimo – Máximo	(0,43 - 20,40)	(0,50 - 0,90)	(0,57 - 4,39)	
	n	4	3	4	
TNF-α	Média	10,06	96,50	7,74	0,8989
	Desvio-padrão	(± 4,25)	(± 154,7)	(± 1,03)	
	Mediana	9,94ª	7,93ª	7,65ª	
	Mínimo – Máximo	(5,66 - 14,70)	(6,43 - 275,12)	(6,57 - 9,09)	
	n	4	3	4	
IFN-γ	Média	1,12	0,42	0,41	0,4379
	Desvio-padrão	(± 1,39)	(± 0,00)	(± 0,03)	
	Mediana	0,46ª	0,42ª	0,41ª	
	Mínimo – Máximo	(0,37 - 3,21)	(0,42 - 0,42)	(0,37 - 3,21)	
	n	4	3	4	

N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as colunas (P≤0,05)

Figura 6 – Representação gráfica das citocinas séricas divididas de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012



N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

A tabela 6 e a figura 6 apresentadas evidenciam que não houve diferença estatisticamente significante a 5% entre os grupos experimentais para o perfil de citocinas séricas testado. No entanto optou-se por manter os dados, mesmo demonstrando ausência de fenômeno em função da escassez de informações deste tipo na literatura consultada.

6.2.2 Perfil lácteo de citocinas

As concentrações lácteas das citocinas IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ foram realizadas empregando-se kits comerciais para ELISA. Os resultados obtidos são apresentados na forma de média, mediana, desvios-padrão, valores mínimos e máximos e P-valor para cada grupo experimental na tabela 6 abaixo.

Tabela 6 – Resultados médios, mediana, desvio-padrão, mínimo, máximo (pg/mL) e valor de P das quantidades lácteas de IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ verificadas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2012

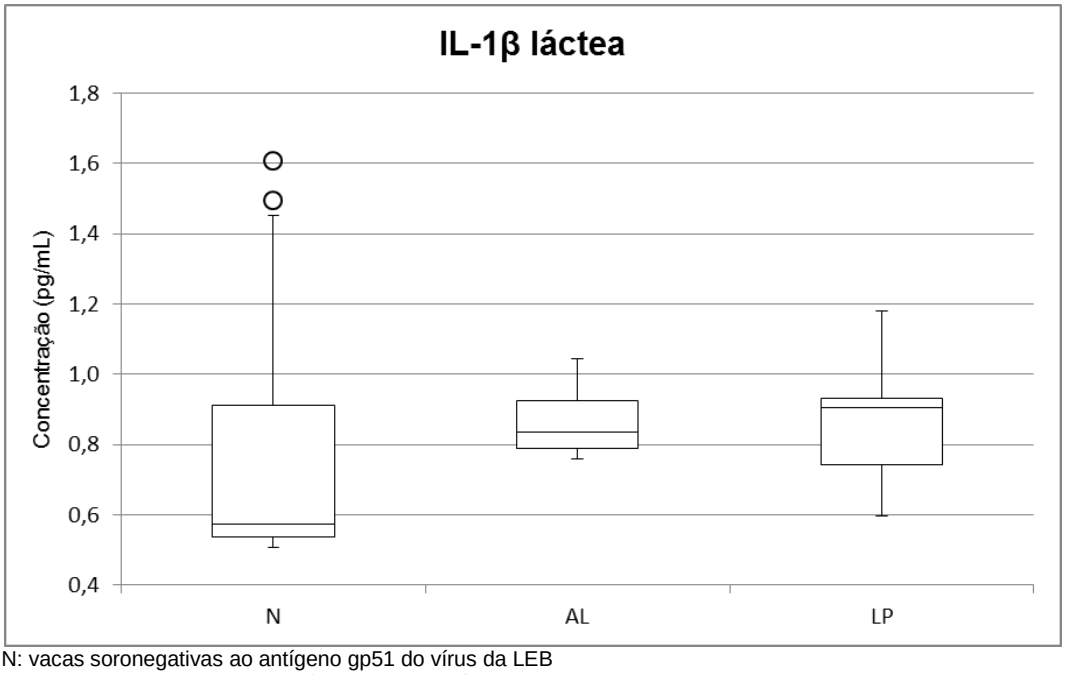
		Grupos			P-valor
		Negativo	AL	LP	
IL-1β	Média	0,78	0,86	0,86	0,0335
	Desvio-padrão	(± 0,39)	(± 0,09)	(± 0,16)	
	Mediana	0,57[a]	0,83[b]	0,91[ab]	
	Mínimo – Máximo	(0,51 - 1,61)	(0,76 - 1,04)	(0,60 - 1,18)	
	n	16	12	16	
IL-4	Média	0,68	0,45	1,31	0,0006
	Desvio-padrão	(± 0,21)	(± 0,10)	(± 1,57)	
	Mediana	0,61[a]	0,45[b]	0,65[a]	
	Mínimo – Máximo	(0,47 - 1,20)	(0,31 - 0,68)	(0,38 - 6,10)	
	n	16	12	16	
TNF-α	Média	6,06	6,85	26,94	0,0281
	Desvio-padrão	(± 1,76)	(± 0,64)	(± 46,87)	
	Mediana	5,66[a]	6,89[ab]	7,19[b]	
	Mínimo – Máximo	(4,09 - 9,52)	(5,79 - 8,05)	(4,88 - 185,57)	
	n	16	12	16	
IFN-γ	Média	0,62	0,42	4,09	0,0548
	Desvio-padrão	(± 0,43)	(± 0,06)	(± 7,39)	
	Mediana	0,40[ab]	0,39[a]	0,53[b]	
	Mínimo – Máximo	(0,28 - 1,50)	(0,36 - 0,54)	(0,32 - 27,00)	
	n	16	12	16	

N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as colunas (P≤0,05)

Observa-se que houve diferença estatisticamente significante a 5% entre os grupos experimentais nas citocinas IL-1β (P=0,00335), IL-4 (P=0,0006) e TNF-α (P=0,0284). No caso da IFN-γ houve diferença estatisticamente significante a 5,5% indicando tendência de diferença entre os grupos (P=0,0548).

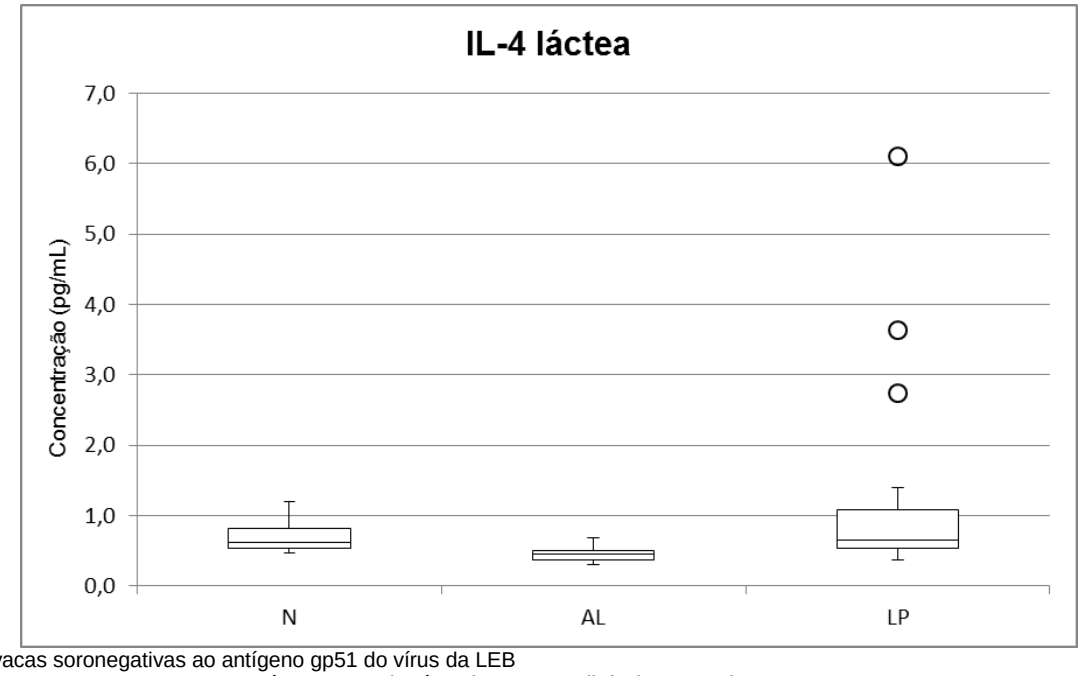
Os valores e comportamentos que representam as concentrações lácteas das citocinas quantificadas divididas por grupo experimental são aqui apresentadas nos gráficos 5, 6, 7 e 8.

Gráfico 5 – Representação gráfica das concentrações de IL-1β divididas de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012



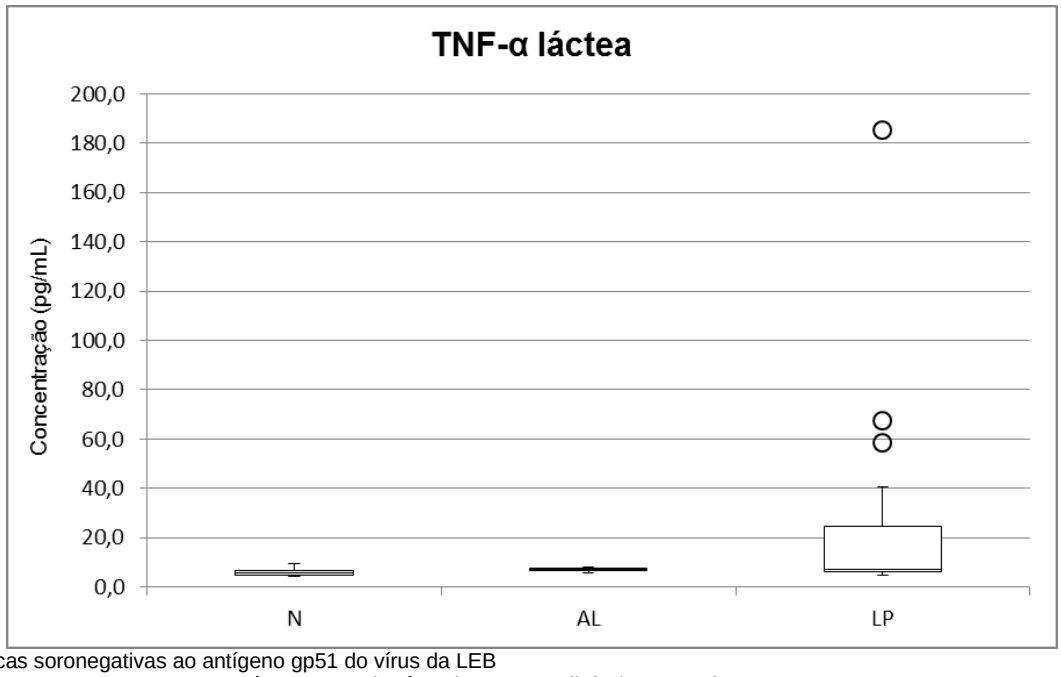
N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Gráfico 6 – Representação gráfica das concentrações de IL-4 divididas de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012



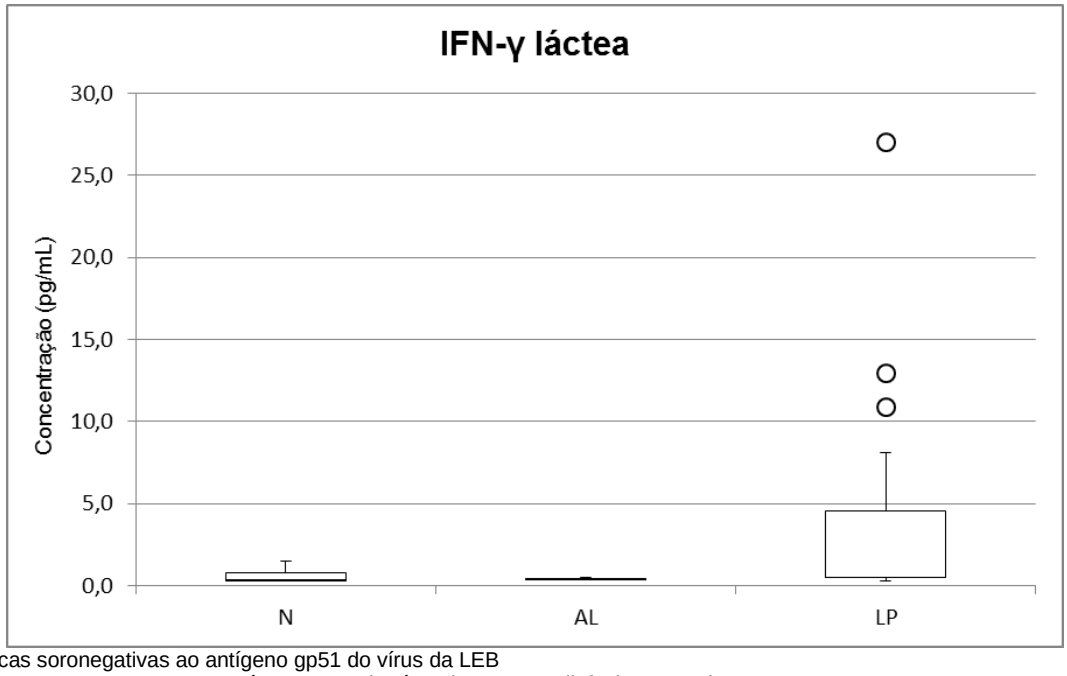
N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Gráfico 7 – Representação gráfica das concentrações de TNF-α divididos de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012



N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Gráfico 8 – Representação gráfica das concentrações de IFN-γ divididos de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012



N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Para verificar quais os grupos diferenciais foram realizadas as comparações múltiplas expostas a seguir nas tabelas 7, 8, 9 e 10.

Tabela 7 – Comparação múltipla para IL-1β mensuradas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função dos grupos experimentais – São Paulo – 2012

Grupo	Grupo	P-valor
Negativo	LP	0,1104
Negativo	AL	0,0846
LP	AL	0,9509

N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Apesar da diferença estatística apontada entre os três grupos avaliados no teste de Kruskal-Wallis (P=0,00335) não foi possível identificar no pós-teste diferença a 5 % entre nenhum dos grupos testados.

As concentrações de IL-1β que apresentaram-se mais próximas de definir diferença estatística a 5 % foram aquela obtidas entre os grupos Negativo e AL (P=0,0846).

Não houve diferença entre os grupos Negativo e LP (P=0,1104) ou mesmo entre o grupo LP e o AL (P=0,9509). Sendo as concentrações de IL-1β maiores nos grupos LP e AL e menores no grupo Negativo (mediana de 0,91 pg/mL, 0,83 pg/mL e 0,57 pg/mL, respectivamente).

Tabela 8 – Comparação múltipla para IL-4 mensuradas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função dos grupos experimentais – São Paulo – 2012

Grupo	Grupo	P-valor
Negativo	LP	0,9402
Negativo	AL	<0,0001
LP	AL	0,0002

N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

As concentrações lácteas de IL-4 apresentaram diferença estatisticamente significante a 5% entre o grupo AL e os grupos Negativo e LP (P=<0,0001 e 0,0002, respectivamente). Não houve diferença entre as amostras do grupo Negativo e LP. Sendo as concentrações de IL-4 maiores nos grupos Negativo e LP e menores no grupo AL (mediana de 0,61 pg/mL, 0,65 pg/mL e 0,45 pg/mL, respectivamente).

Tabela 9 – Comparação múltipla para TNF-α mensuradas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função dos grupos experimentais – São Paulo – 2012

Grupo	Grupo	P-valor
Negativo	LP	0,0261
Negativo	AL	0,1309
LP	AL	0,6043

N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

No caso do TNF-α as concentrações lácteas apresentaram diferença estatisticamente significante a 5% entre o grupo Negativo e o grupo LP (P=0,0261). Não houve diferença entre as amostras do grupo Negativo e AL, bem como entre o grupo AL e LP. Sendo as concentrações de TNF-α maiores nos grupos AL e LP e

menores no grupo Negativo (mediana de 6,89 pg/mL, 7,19 pg/mL e 5,66 pg/mL, respectivamente).

Tabela 10 – Comparação múltipla para IFN-γ mensuradas nas 11 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função dos grupos experimentais – São Paulo – 2012

Grupo	Grupo	P-valor
Negativo	LP	0,2357
Negativo	AL	0,9993
LP	AL	0,0226

N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

No caso da IFN-γ se considerarmos que houve tendência de diferença estatística a 5,5%, como apresentado na tabela 8, os grupos diferenciais seriam o grupo AL e o grupo LP (P=0,0226). Não houve diferença entre as amostras do grupo Negativo e os demais grupos. Sendo as concentrações de IFN-γ maiores nos grupos Negativo e LP e menores no grupo AL (mediana de 0,40 pg/mL, 0,53 pg/mL e 0,39 pg/mL, respectivamente). Contudo, vale ressaltar que neste caso os valores de medianas apresentados para os animais negativos e AL são muito pouco diferentes (P=0,9993).

6.2.3 Comparação entre os perfis sérico e lácteo de citocinas

As diferenças entre as concentrações das citocinas estudadas no sangue e no leite (variável delta) estão apresentadas na tabela 11 abaixo.

Tabela 11 – Comparação entre as concentrações das citocinas séricas e lácteas obtidas da totalidade dos animais selecionados neste estudo – São Paulo – 2012

		Sangue	Leite	Delta	P-valor
IL-1β	Média	2,86	0,83	2,03	< 0,0001
	Desvio-padrão	(± 3,78)	(± 0,26)	(± 3,52)	
	Mediana	1,42[a]	0,82[b]	0,60	
	Mínimo – Máximo	(0,91 – 13,85)	(0,51 – 1,61)	(0,40 - 12,24)	
	n	11	44	11	
IL-4	Média	2,75	0,84	1,91	0,3326
	Desvio-padrão	(± 5,96)	(± 1,00)	(± 4,96)	
	Mediana	0,68[a]	0,58[a]	0,10	
	Mínimo – Máximo	(0,43 – 20,40)	(0,31 – 6,10)	(0,10 - 14,30)	
	n	11	44	11	
TNF-α	Média	32,79	13,86	18,93	0,0264
	Desvio-padrão	(± 80,41)	(± 29,45)	(± 50,96)	
	Mediana	7,65[a]	6,79[b]	0,86	
	Mínimo – Máximo	(5,66 – 275,12)	(4,09 – 185,57)	(1,57 – 89,55)	
	n	11	44	11	
IFN-γ	Média	0,67	1,82	-1,15	0,5484
	Desvio-padrão	(± 0,84)	(± 4,70)	(± 3,86)	
	Mediana	0,42[a]	0,47[a]	-0,05	
	Mínimo – Máximo	(0,37 – 3,21)	(0,28 – 27,00)	(0,09 – (-23,79))	
	n	11	44	11	

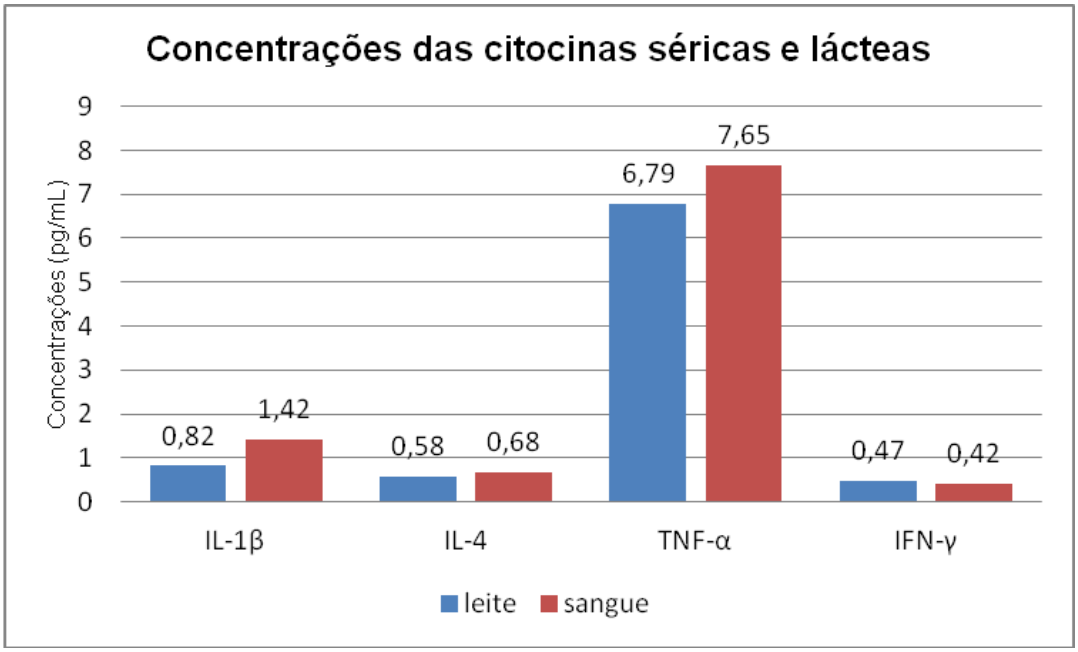
N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as colunas (P≤0,05)

Conforme observa-se na tabela 11 apresentada acima as medianas das concentrações de citocinas no sangue foram maiores do que aquelas encontradas no leite nos casos da IL-1β, IL-4 e TNF-α, sendo que para IFN-γ a mediana da concentração láctea foi maior do que a sanguínea, porém sem significância estatística (P=0,5484).

Houve diferença significante a 5% para a IL-1β (P≤0,0001) e para TNF-α (P=0,0264).

As medianas aqui citadas encontram-se representadas no gráfico 9.

Gráfico 9 – Representação gráfica das concentrações das citocinas séricas e lácteas (pg/mL) de toda a população testada – São Paulo – 2012



Comparada a variável delta (sangue – leite) dividida de acordo com os grupos experimentais não encontrou-se diferenças significativas a 5 %, como pode ser observado na tabela 12 e gráficos 10, 11 e 12 abaixo.

Tabela 12 – Contribuição dos grupos experimentais para formação do delta entre as concentrações de citocinas no leite e no sangue dos animais – São Paulo – 2012

		Grupos			P-valor
		Negativo	AL	LP	
IL-1β	Média	3,81	1,75	0,68	0,2274
	Desvio-padrão	(± 6,3)	(± 1,38)	(± 1,02)	
	Mediana	0,83ª	1,18ª	0,23ª	
	Mínimo – Máximo	(0,33 - 13,25)	(0,75 - 3,32)	(0,07 - 2,20)	
	n	4	3	4	
IL-4	Média	4,8	0,16	0,30	0,8243
	Desvio-padrão	(± 9,74)	(± 0,13)	(± 2,62)	
	Mediana	0ª	0,15ª	0,12ª	
	Mínimo – Máximo	(-0,22 - 19,41)	(0,04 - 0,29)	(-2,72 - 3,67)	
	n	4	3	4	
TNF-α	Média	4,34	90,33	0,16	0,7499
	Desvio-padrão	(± 5,5)	(± 155,45)	(± 3,65)	
	Mediana	4,14ª	0,93ª	1,14ª	
	Mínimo – Máximo	(-1,03 - 10,11)	(0,22 - 269,83)	(-4,98 - 3,35)	
	n	4	3	4	
IFN-γ	Média	0,73	0,02	-0,25	0,4169
	Desvio-padrão	(± 1,45)	(± 0,03)	(± 0,44)	
	Mediana	0,07ª	0,01ª	-0,09ª	
	Mínimo – Máximo	(-0,12 - 2,89)	(0,00 - 0,05)	(-0,90 - 0,07)	
	n	4	3	4	

N: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
AL: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB sem linfocitose persistente
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as colunas (P≤0,05)

Gráfico 10 – Representação gráfica da variável delta (sangue-leite) de citocinas no grupo experimental Negativo – São Paulo – 2012

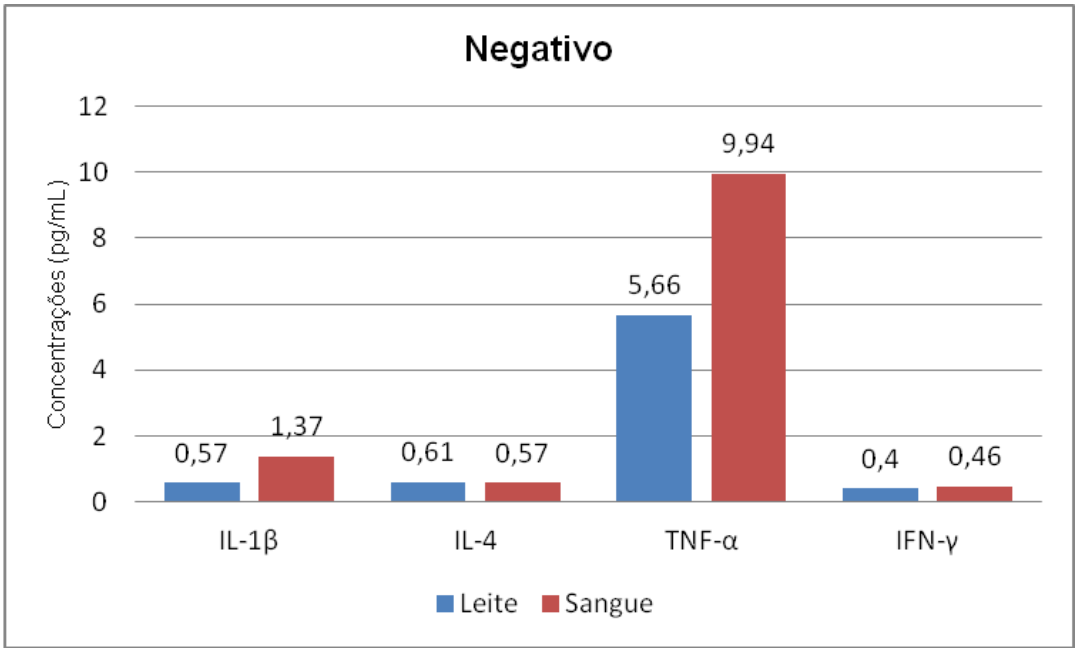
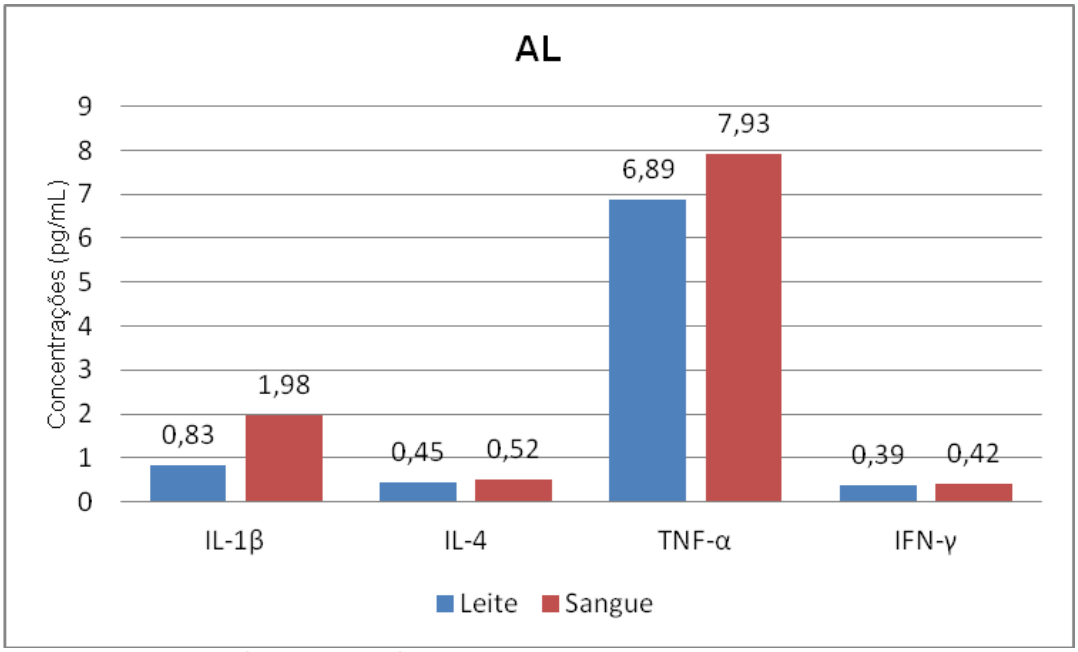
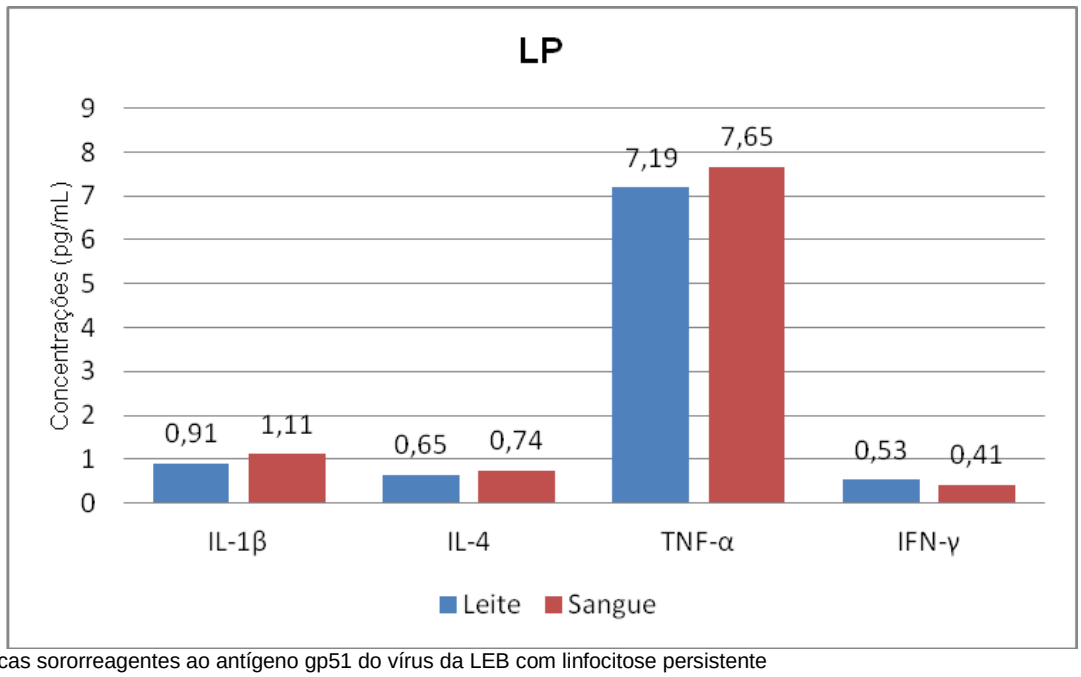


Gráfico 11 – Representação gráfica da variável delta (sangue-leite) de citocinas no grupo experimental AL – São Paulo – 2012



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

Gráfico 12 – Representação gráfica da variável delta (sangue-leite) de citocinas no grupo experimental LP – São Paulo – 2012



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

7 DISCUSSÃO

7.1 TRIAGEM

Com o intuito de investigar possíveis interferências que a LEB possa causar aos principais sistemas imunitários, sistêmicos e das glândulas mamárias isoladamente, de animais naturalmente infectados pelo VLB, o presente estudo buscou homogeneizar os grupos para não tendenciar variações causadas por outros fatores de estimulação que não fossem a presença do vírus, como diferenças no manejo dos animais, sejam estas comportamentais, nutricionais, edafoclimáticas, sanitárias ou outras.

Duas propriedades produtoras de leite B localizadas na região nordeste do estado de São Paulo foram avaliadas e 194 vacas submetidas a um relativamente longo período de triagem (aproximadamente quatro meses). Depois de verificados e atendidos todos os critérios de inclusão estabelecidos e descritos no capítulo de material e métodos desta dissertação, foi realizada a seleção de onze animais distribuídos em três grupos, a saber: negativo, contendo quatro animais, positivos e alinfocitóticos, contendo três animais, positivos manifestando linfocitose persistente (LP), contendo mais quatro animais, para a quantificação das concentrações de IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ nas amostras de sangue e soro lácteo.

Consideraram-se negativas para a LEB as vacas não sororreagentes no teste de ELISA, e como positivas as sororreagentes no teste de IDGA. Esta estratégia não traz grandes novidades, porém difere de outros estudos onde o diagnóstico para a LEB procedeu-se exclusivamente por IDGA. O emprego destas técnicas associadas já vem sendo utilizada por esta equipe a algum tempo visando evitar resultados falso-negativos e falso-positivos (AZEDO, 2010; SOUZA, 2010; BLAGITZ, 2011).

O índice de prevalência da doença encontrado durante este estudo foi de 50,50%, valor que não difere de outros relatos de pesquisadores que utilizaram a mesma técnica de sorodiagnóstico (IDGA), em rebanhos leiteiros brasileiros tecnificados (BIRGEL JUNIOR et al., 1995; AZEDO, 2010; BLAGITZ, 2011). Já o índice de animais manifestando linfocitose persistente foi de 36,36% do total de

animais positivos, avaliados durante a triagem, e 27,27% manifestavam o *status* de alinfocitóticos. Estes valores também ficaram próximo aos encontrados por outros pesquisadores desta equipe, e não diferem de vários outros relatados que sugerem que até 33% dos animais acometidos manifestarão este *status* de LP ao longo de suas vidas (SCHWARTZ; LEVY, 1994; STÖBER, 2005; MORATORIO et al., 2010; INOUE et al., 2011; ERKISNE et al., 2012).

Ressalta-se neste cenário que a forte pressão de seleção dos animais imposta para este estudo pode anular em parte um dos principais efeitos cogitados para o VLB no que tange o aumento da susceptibilidade dos bovinos infectados a outras enfermidades, inclusive a mastite, cuja estreita relação com a LEB já foi descrita por Rinaldi, Li e Capuco (2010).

Dados não publicados obtidos por este grupo apontam a mastite como uma importante variável de confusão na leitura da sinalização realizada pelas citocinas em animais sororreagentes ou não ao VLB. Testes estatísticos hierarquizados sugerem significativa diferença no perfil de citocinas estudado quando a mastite não foi eliminada da amostra.

Fatos como estes justificam a opção de trabalho com um “n” reduzido porém sem a presença desta variável de confusão nas amostras estudadas.

Outro ponto a ser considerado neste sentido é que se tratarmos cada um dos quartos mamários como entidades isoladas, como sugerido por Sordillo, Shafer-Weaver e De Rosa (1997), o valor prático do “n” para as avaliações lácteas realizadas seria de 16, 12 e 16 para os grupos Negativo, AL e LP, respectivamente.

Vale frisar que o efeito da individualidade dos animais não seria amenizado por esta linha de raciocínio.

Para este estudo, como citado anteriormente, a proposta centrou-se fielmente sobre a avaliação da resposta imunitária na presença do VLB minimizados outros fatores ou estímulos controláveis ao sistema imune dos animais.

7.2 PERFIL DE CITOCINAS

7.2.1 Perfil sérico de citocinas

Uma das teorias que se propõem a esclarecer a gênese e progressão da enfermidade nos animais acometidos pelo VLB baseia-se sobre a afirmação de que uma mudança no padrão da resposta imune celular (Th1) para humoral (Th2), bem como a taxa viral estabelecida durante o processo infeccioso, possam estar envolvidas com a progressão da enfermidade (PYEON; O'REILLY; SPLITTER, 1996; MURAKAMI et al., 2011).

Por consagração o que tem sido apontado de forma mais constante e consistente na literatura científica acerca do comportamento das citocinas séricas selecionadas para este estudo (IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ) pode ser visualizado em estudos como os de Azedo (2010) onde os resultados das concentrações de TNF-α foram maiores no grupo LP do que nos grupos AL e negativo ($P \leq 0,01$).

Fato que pode ser justificado sobre a afirmação de Kabeya, Ohashi e Onuma (2001) que sugerem que em microambientes balizados por respostas imunes preponderantemente marcados por citocinas Th2 o aumento da IL-10 possa ser responsável pela ação do TNF-α sobre os receptores da superfície celular determinando a gênese da LP, destaca-se que desta forma o TNF-α agiria como um fator de crescimento associado a proliferação celular quando associado ao perfil Th2 de citocinas. Estas afirmações também são compartilhadas por outros autores como Amills et al. (2004) e Konnai et al. (2006) porém sugerindo que nas fases iniciais da infecção esta citocina possa, inclusive, estar envolvida nas tentativas de eliminação do VLB.

Azedo (2010) demonstra também que as concentrações obtidas a partir das avaliações de IFN-γ demonstraram maiores valores no grupo de animais AL em comparação aos grupos negativo e LP ($P \leq 0,01$), tal fato é comum ao reportado por outros autores como Burdin et al. (1995).

Mais uma vez, achados como estes justificam-se por diversas outras citações de literatura que visualizam no IFN-γ uma importante citocina com atividade antiviral,

fator que pode ser figurado nas afirmações de Usui et al. (2007) que demonstraram que bovinos apresentando altas concentrações de IFN possuíam menor carga viral.

A análise pela técnica de RT-PCR competitiva, para detectar a expressão do RNAm para o IFN-γ, característico das respostas celulares, foi realizada em bovinos experimentalmente infectados com o VLB. Resultados mostraram que em animais experimentalmente infectados com o VLB que desenvolveram LP houve aumento da síntese de IFN-γ durante a terceira e quarta semana após a infecção. Por outro lado, os animais sororreagentes e assintomáticos (AL) expressaram altos níveis de RNAm de IFN-γ durante todas as semanas do experimento (1-24 semanas). Resultados como estes também sugerem que animais que possuem uma expressão precoce e prolongada de IFN-γ possam retardar ou inibir o aparecimento do *status* de linfocitose persistente (YAKOBSON et al., 2000).

Neste ponto outro viés de discussão passa a ser relevante. Está bem estabelecido que a IFN-γ atua na polarização da resposta imune Th1 inclusive por sua ação antagônica a IL-4 (LIEW, 2002). Este fato sustenta muitos dos achados apresentados na literatura quanto a atuação desta citocina na inibição ou retardamento na progressão da doença para LP e no estabelecimento do *status* AL (YAKOBSON et al., 2000; USUI et al., 2007).

No entanto deve-se ter em mente que o aumento da IFN-γ nos animais AL pode ser dependente da carga proviral presente em cada um destes indivíduos (USUI et al., 2007). Juliarena et al. (2009) estudaram a associação de determinados alelos do gene BoLA com os níveis de taxa proviral e a capacidade de produção de anticorpos contra outros vírus em animais infectados pelo VLB. Um dos critérios de divisão dos grupos neste estudo foi exatamente o nível de taxa proviral (baixa taxa proviral ou alta taxa proviral). Identificou-se que 40% dos animais que apresentavam alta taxa proviral eram sororreagentes ao VLB sem linfocitose persistente.

Configura-se nesta situação a condição de que animais AL possam ter suas respostas imunes correlacionadas ao VLB em função também da taxas provirais e que estas como sugerido por Usui et al. (2007) possam interferir nas concentrações de citocinas liberadas na presença do VLB, inclusive e por exemplo da própria IFN-γ.

A IL-1β, normalmente induzida em resposta a estímulos inflamatórios como a presença de TNF-α, IFN-β, LPS, vírus e outros antígenos, regula várias atividades fisiológicas incluindo reações inflamatórias e respostas imunes (DINARELLO, 1989;

THOPAM et al., 1998;TAYAL; KALRA, 2008). Com base no exposto seria esperado que concentrações de IL-1β também se encontrassem aumentadas em conjunto as demais citocinas de perfil pró-inflamatório (Th1) nos quadros de animais sororeagentes apresentando alinfocitose, porém dados relatados por Altreuther et al. (2000) não encontraram alterações na expressão de IL-1β em monócitos bovinos infectados pelo VLB *in vitro*.

Da mesma maneira expressões de RNAm das citocinas IL-1β foram pobremente detectadas por Amills et al. (2004) em células mononucleares do sangue provenientes de animais com LEB. Contudo após curto período de permanência destas células em cultura, os autores observaram drástico aumento na expressão de RNAm desta citocina. A principal conclusão que se pode tirar sobre o relatado acima é que a atividade transcripcional dos genes que codificam a IL-1β é diminuída em células B bovinas frescas, mas podem aumentar rapidamente após curto período em cultura, inferindo que a condição associada à cultura celular pode facilitar ativações não-específicas de células T e/ou B (KEEFE et al., 1997).

Quanto as citocinas testadas neste experimento e tidas como padrão Th2 (IL-4), Trueblood et al. (1998) encontraram-nas aumentadas em animais sororreagentes para LEB manifestando LP. Já Amills et al. (2002) defendem que a expressão de RNAm da IL-4 em animais sororreagentes para LEB manifestando *status* de alinfocitose foram maiores do que naqueles que apresentavam LP.

Em contrapartida Keefe et al. (1997) não observaram diferenças significativas entre animais infectados pelo VLB e não infectados quanto as concentrações de IL-4 e IL-10. O mesmo comportamento observado por Yokoyama et al. (1979) que não detectaram nenhuma atividade aparente no RNAm de citocinas em células mononucleares do sangue periférico de vacas infectadas pelo VLB. Tais fatos não são totalmente inesperados uma vez que estas células não são típica e continuamente ativadas sem que haja qualquer estímulo além da presença viral.

No presente estudo, em acordo com o reportado por Yokoyama et al. (1979) e Keefe et al. (1997) e ao contrário do que ocorre em muitos outros estudos associando concentrações de citocinas séricas a manifestação de diferentes formas clínicas da LEB, não foram encontradas diferenças significativas a 5% entre os grupos experimentais para nenhuma das citocinas séricas testadas (IL-1β (P=0,3126), IL-4 (P=0,5197), TNF-α (P=0,8989) e IFN-γ (P=0,4379)).

Dentre várias outras possibilidades tal fato pode ser decorrente dos altos coeficientes de variação resultantes das amostras de sangue dos grupos experimentais formados, em função do reduzido “n”, como pode ser visto na tabela 13 abaixo.

Tabela 13 – Coeficientes de variação das citocinas séricas divididas de acordo com os grupos experimentais – São Paulo – 2012

Citocinas	N	AL	LP
IL-1β	144%	55%	57,5%
IL-4	181%	36%	115%
TNF-α	42%	160%	13%
IFN-γ	124%	0%	7,3%

N – vacas soronegativas ao VLB
AL – vacas sororreagentes ao VLB sem linfocitose persistente
LP – vacas sororreagentes ao VLB com linfocitose persistente

Outra possibilidade a ser estudada, neste sentido, decorre da visão de Usui et al. (2007) que responsabilizam as diferenças encontradas na resposta do IFN-γ, por exemplo, contra a infecção experimental pelo VLB em ovinos com uma variação da susceptibilidade individual dos animais.

Sob outro aspecto estes achados também podem sugerir a possibilidade de que em respostas aumentadas no IFN-γ nos bovinos, assim como reportado para os ovinos, a baixa taxa proviral contribua para a proteção da progressão da linfocitose e com isto não permita a visualização das diferentes fases da progressão da doença por meio das concentrações de citocinas (MOND et al., 1986).

Mais um ponto que deve ser levado em conta nesta análise é que pelo fato deste estudo optar pelo uso de somente animais naturalmente infectados pelo VLB não foi possível determinar em que momento da infecção cada um dos envolvidos encontrava-se, ou seja, em quais dos indivíduos a resposta imune era aguda ou crônica. Esta condição traz sua importância baseada no fato de que as respostas de determinadas citocinas variam não só de acordo com a carga viral, mas também, com o momento em que o estímulo imunológico é imposto e do esforço do organismo animal para evitar a propagação deste vírus.

As diferenças encontradas entre as quantidades de citocinas presentes neste estudo em comparação a outros também pode ser explicada em função da

sensibilidade dos testes ELISA aplicados, uma vez que alguns autores utilizam kits específicos para espécie enquanto que neste caso os kits utilizados foram quase que invariavelmente adaptados de kits ELISA para testes em humanos cujas citocinas apresentassem alto grau de homologia (acima de 60%) conforme apontado por Scheerlinck (1999), exceção feita ao kit comercial ELISA para mensuração de IL-4 que foi específico para amostras bovinas por esta proteína apresentar homologia abaixo dos 60% indicados (56,9%).

Outro ponto que deve ser ressaltado é que nos testes de ELISA os valores de citocinas mensurados são aqueles provenientes de sua liberação pelas células enquanto que amostras avaliadas por PCR medem a expressão de RNAm das citocinas no material genético da célula. Oliveira et al. (1998) defendem que apesar deste pormenor pode-se afirmar que há uma forte correlação entre os níveis de transcrição de RNAm e o padrão secretório de citocinas liberadas pelos linfócitos uma vez que por própria característica destas proteínas elas não costumam ser armazenadas em sua condição pré-formadas (VARELLA; FORTE, 2001; COHEN; BIGAZZI; YOSIGAHIDA, 2004; ROMAGNANI, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Porém, ainda neste contexto, não se deve deixar de lado que a característica efêmera das citocinas associada a seu padrão de liberação na forma de surtos em resposta a determinados estímulos (COHEN; BIGAZZI; YOSIGAHIDA, 2004; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012) pode tornar sua mensuração na forma de proteína livre bastante imprevisível quando não se estabelece um desafio imunológico controlado e conhecido.

Como se pôde observar nos relatos descritos acima há razoável consenso quanto ao comportamento das concentrações da IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ no sangue de animais sororreagentes para LEB manifestando ou não *status* de LP, porém dados científicos demonstrando a mensuração destas citocinas, diretamente sobre o soro lácteo de bovinos positivos para LEB parecem bastante escassos e não foram localizados durante o desenvolvimento deste estudo.

7.2.2 Perfil lácteo de citocinas

É sabido que as células epiteliais, macrófagos e leucócitos residentes da glândula mamária são importantes produtores de citocinas (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). McClenahan, Sotos e Czuprynski (2005) sugerem que o número absoluto de células epiteliais encontrados na glândula mamária daria a estas o potencial de serem as principais contribuintes na produção de citocinas contidas no leite e no soro de vacas com mastites experimentalmente induzidas ou naturalmente adquiridas. Todavia ainda não está claro se estas células realmente possuem tal capacidade e de que maneira isto aconteceria.

Durante o presente estudo a avaliação quantitativa das citocinas (IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ) no soro lácteo, verificou-se que as medianas das concentrações de IL-1β dos animais positivos (grupo LP e AL) foram significativamente maiores do que aquelas observadas nos animais pertencentes ao grupo negativo (0,91 pg/mL, 0,83 pg/mL e 0,57 pg/mL, respectivamente (P=0,0335)).

Tais concentrações de IL-1β presentes no soro lácteo verificadas neste estudo foram obtidas por meio da utilização de kit comercial ELISA *Interleukin-1β Human, Biotrack easy system*[20]. Este kit para a espécie humana pôde ser utilizado com segurança uma vez que a IL-1β humana apresenta grau de homologia (acima de 60% (62%)), como sugerido por Scheerlinck (1999), com a IL-1β bovina.

As medianas das concentrações no soro lácteo de IL-4 dos animais pertencentes ao grupo LP foram significativamente maiores do que aquelas observadas nos animais pertencentes ao grupo AL e semelhantes as do grupo de animais negativos (0,65 pg/mL, 0,45 pg/mL e 0,61 pg/mL, respectivamente (P=0,0006)).

Tais concentrações de IL-4 presentes no soro lácteo verificadas neste estudo foram obtidas por meio da utilização de kit comercial ELISA *Bovine Interleukin-4 Screening set*[21]. Este kit trata-se de material comercial desenvolvido especificamente para amostras da espécie bovina.

---

[20] GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA; n°. code RPN2751

[21] Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA; n°. code ESS00331

No caso do TNF-α, verificou-se que as medianas das concentrações foram estatisticamente significantes a 5% entre os três grupos avaliados, sendo que as concentrações dos grupos positivos AL e LP foram maiores do que aquelas encontradas no grupo negativo (6,89 pg/mL, 7,19 pg/mL e 5,66 pg/mL, respectivamente (P=0,0281)).

O kit ELISA comercial utilizado foi o desenvolvido para testes em amostras humanas *(TNF-α Human, Biotrack Easy ELISA kit*[22]*)* considerando o alto grau de homologia entre a TNF-α humana e bovina (81%).

Quanto a avaliação das concentrações das medianas no soro lácteo da IFN-γ, o presente estudo verificou que os valores obtidos a partir dos animais pertencentes ao grupo AL apresentaram tendência a diferença (P=0,055) ao grupo LP, porém com concentrações mais altas neste grupo em relação ao AL.

Conforme citado anteriormente este comportamento não é totalmente inesperado uma vez que a taxa proviral nos animais AL pode variar mimetizando nestes animais concentrações de citocinas semelhantes ao grupo Negativo, como ocorrido neste estudo (P=0,9993).

Neste caso também o kit ELISA comercial utilizado foi o desenvolvido para testes em amostras humanas *(IFN-γ Human, Biotrack ELISA kit*[23]*)* considerando o alto grau de homologia entre a IFN-γ humana e bovina (63 %).

Conforme pode se verificar as concentrações das citocinas escolhidas para este estudo na glândula mamária apresentaram comportamentos semelhantes àqueles tidos como consagrados em outros estudos no que tange seus níveis séricos.

Vale reiterar que dados científicos publicados demonstrando a quantificação de citocinas no soro lácteo de bovinos sororreagentes para o VLB parecem bastante escassos e não foram localizados durante o desenvolvimento deste estudo. Portanto as relações apresentadas a partir deste ponto no que diz respeito à influência do VLB neste órgão levam em conta o conhecimento disponível sobre a atuação das citocinas na LEB no organismo animal de forma geral e de algumas inferências possíveis sobre a ação das citocinas em outras doenças da glândula mamária.

---

[22] GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA; n°. code RPN5697

[23] GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA; n°. code RPN2787

O comportamento aumentado das concentrações de IL-1β nos grupos AL e LP estão em acordo com a afirmação de que esta citocina é normalmente induzida em resposta à presença de vírus entre outros estímulos inflamatórios (DINARELLO, 1989; THOPAM et al., 1998;TAYAL; KALRA, 2008). O fato de este aumento ser inespecífico entre os grupos AL e LP pode ser explicado em decorrência da variável de confusão já apontada nesta discussão quanto a cronicidade do processo infeccioso e da capacidade pleitrópica das citocinas.

A IL-4, por tratar-se de citocina pertencente ao perfil Th2, comportou-se dentro do esperado sendo encontrada em maiores concentrações no grupo LP, onde ao menos teoricamente já houve a transição do padrão de resposta Th1 para Th2 e a subsequente proliferação policlonal não maligna de linfócitos B (TRUEBLOOD et al., 1998).

Similar aos resultados apresentados por Azedo (2010) as concentrações de TNF-α foram maiores no grupo LP do que nos animais pertencentes aos grupos AL e negativo (P=0,0281). Com base nas informações de Usui et al. (2006) sugere-se que memTNF-α induzidos na superfície de células B possam suportar a expansão celular nos animais com base em seus efeitos autócrinos via ativação de TNF-R2 ou pela modulação com outros tipos celulares como as células T *helper*. A justificativa para este comportamento pode estar baseada na afirmação de Kabeya, Ohashi e Onuma (2001) de que em microambientes preponderantemente Th2 a ação do TNF-α induzida por outras citocinas Th2, sobre os receptores da superfície de células infectadas possa estar envolvida na gênese da LP.

Os resultados obtidos a partir das amostras de soro lácteo processadas pelo teste de ELISA para IFN-γ demonstraram tendência de diferença estatística a 5,5% entre os grupos experimentais, sendo que os valores de mediana foram 0,40 pg/mL, 0,39 pg/mL e 0,53 pg/mL para os grupos negativo, AL e LP, respectivamente (P=0,055) encaixam-se nos resultados apontados por Yakobson et al. (2000) que citam a análise pela técnica de RT-PCR competitiva na detecção da expressão do RNAm para o IFN-γ em bovinos experimentalmente infectados com o VLB. Estes resultados demonstraram que em animais experimentalmente infectados com o VLB que desenvolveram LP houve aumento da síntese de IFN-γ durante a terceira e quarta semana após a infecção. Evidentemente justificasse aqui novamente a

discussão de que tipo de resposta imune (aguda ou crônica) estes animais estariam vivenciando no momento da coleta.

Trueblood et al. (1998) defendem, ainda, que a ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B normais são largamente mediadas pelos linfócitos T, tanto pelo contato direto célula a célula, quanto pela liberação de citocinas e que as IL-2, IL-4, IL-10 e IFN-γ atuam isolada e sinergicamente para promover estas ações sobre os linfócitos B, fato este que também poderia justificar o aumento desta citocinas em animais manifestando linfocitose persistente.

Enfim, pode-se afirmar que neste estudo os resultados verificados sobre as concentrações lácteas de citocinas em vacas sororreagentes para LEB manifestando quadros de linfocitose persistente ou não, obtidas por meio de teste ELISA, foram coerentes com aquelas apresentadas na literatura científica no que tange o comportamento destas citocinas no sangue nos diferentes *status* da enfermidade, sugerindo que estas citocinas possam realmente atuar na progressão dos reflexos da enfermidade na glândula mamária dos animais infectados pelo VLB inclusive podendo ser importantes na susceptibilidade deste órgão a outras infecções (RINALDI; LI; SPLITTER, 2010).

Esta condição pode sugerir que o “n” reduzido utilizado durante este experimento não foi capaz de inibir o efeito do fenômeno por trás das relações da glândula mamária com o VLB.

7.2.3 Comparações entre os perfis séricos e lácteos das citocinas estudadas

Com o intuito de identificar se as respostas imunes comportavam-se de forma diferente em termos de concentrações de citocinas no leite e no sangue foram realizadas as comparações das medianas de cada um dos itens mensurados. Foram encontradas diferenças significativas a 5% nas variáveis IL-1β e TNF-α, sendo que ambas apresentaram maiores concentrações no sangue do que no leite (Delta de 0,60 pg/mL (P<0,0001) e 0,86 pg/mL (P=0,0264), respectivamente).

Comportamento semelhante a este foi observado nas concentrações de IL-4 (0,68 pg/mL no sangue e 0,58 pg/mL no leite, Delta de 0,10 pg/mL), porém neste caso não houve diferença estatística a 5 % (P=0,3326).

O único caso onde observa-se mudança deste padrão nas citocinas estudas baseia-se nos resultados das concentrações de IFN-γ encontradas em maiores níveis no leite do que no sangue dos animais. Contudo neste caso também não houve diferença estatística a 5% (P=0,5484).

Tais resultados estão de acordo com as afirmações de Politis et al. (1991) de que as células do sangue possuem maior capacidade produtiva de citocinas do que as células residentes da glândula mamária.

Estes resultados foram aplicados a cada um dos grupos experimentais selecionados para este estudo, porém não foi possível identificar efeito de nenhum destes sobre tais diferenças.

CAPÍTULO 2 – QUANTIFICAÇÃO DO PERFIL LÁCTEO DE IL-10 EM VACAS NATURALMENTE INFECTADAS PELO VÍRUS DA LEUCOSE ENZOÓTICA DOS BOVINOS.

8 INTRODUÇÃO

Defesas celulares e moléculas solúveis efetoras como citocinas, proteínas de fase aguda e fatores do sistema complemento, representam componentes importantes do sistema imunológico da glândula mamária justificando a grande quantidade de estudos sobre o papel destes elementos na saúde e na doença deste órgão (SORDILLO; STREICHER, 2002; BANNERMAN, 2009; CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

A interleucina-10 (IL-10) trata-se de citocina chave no controle das respostas imunológicas por possuir importante papel imunorregulatório baseado em sua capacidade de inibir a síntese de outras citocinas, principalmente, aquelas tidas como pró-inflamatórias. Sua atuação regula, ainda, as respostas imunes inibindo a proliferação de células Th1, diminuindo a função citolítica e secretória dos linfócitos Th1 e facilitando o desenvolvimento de resposta do tipo Th2.

Dados disponíveis na literatura assinalam para a existência de grande quantidade de partículas do VLB em células da glândula mamária e na fração celular de fluídos corpóreos como o leite e o colostro (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL, 2008; ASADPOUR; JAFARI, 2010; GUTIÉRREZ et al., 2011; INOUE et al., 2011; MURAKAMI et al., 2011). Além disso, resultados como os apontados por Rinaldi, Li e Capuco, (2010) e Blagitz (2011), entre outros, apontam para um evidente envolvimento deste vírus na resposta imunológica da glândula mamária.

Enfim, considerando-se a predileção do VLB sobre os linfócitos B e sua característica de desenvolver quadros de expansão policlonal não maligna destas células em aproximadamente 33% dos animais acometidos, além de sua comprovada presença na glândula mamária dos animais infectados, cogitou-se a hipótese de que a IL-10, por seu perfil imunorregulatório possa estar envolvida no estabelecimento e manutenção destes processos nos animais sororreagentes para o VLB.

Desta forma objetivou-se no presente estudo a quantificação das concentrações lácteas de IL-10 no soro lácteo de vacas naturalmente infectadas

pelo VLB minimizados outros aspectos de estimulação induzida do sistema imunológico que não fosse a presença do próprio vírus *in vivo.*

9 MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução do presente estudo, as mensurações das concentrações de citocinas foram precedidas por uma fase de triagem dos animais e divisão dos grupos experimentais conforme descrito a seguir.

9.1 ANIMAIS UTILIZADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi dividido em duas fases. Durante a primeira fase foi realizada triagem de 194 vacas da raça Holandesa, mantidas em sistema de produção conforme as exigências para a produção de leite do tipo B, localizadas nos municípios de Tambaú – SP e Santa Rita do Passa Quatro – SP. Estes animais foram avaliados quanto a presença de infecção pelo VLB.

Foram também realizados testes de avaliação do úbere “ao pé da vaca” (avaliação física do úbere e tetos, teste de Tamis e *California mastitis test*) de cada um dos animais pertencentes aos grupos experimentais, e, subsequentemente, amostras de leite foram colhidas e submetidas à contagem de células somáticas e exame bacteriológico.

Considerou-se como critérios de inclusão amostral a ausência de alterações ao exame físico do úbere, e demais testes apontados acima, ausência de tetos afuncionais ou antecedentes de tratamento para mastite por no mínimo 30 dias, contagem de células somáticas ≤ 250.000 cél/mL, resultado negativo no exame bacteriológico do leite e estabilidade do perfil hematológico.

Na segunda fase, os animais selecionados para cada um dos grupos experimentais (negativos e positivos) tiveram suas amostras de leite avaliadas para a concentração de IL-10.

9.2 PRIMEIRA FASE

O presente estudo teve sua primeira fase, ou fase de triagem, caracterizada pela avaliação dos parâmetros hematológicos e lácteos necessários a verificação dos critérios de inclusão amostral e definição dos grupos experimentais.

As figuras 7 e 8 expostas abaixo apresentam uma representação esquemática do processo de seleção dos animais, bem como da construção dos grupos experimentais sob o ponto de vista hematológico e lácteo, respectivamente.

Figura 7 – Representação esquemática das etapas de triagem e formação dos grupos experimentais correlacionadas às amostras de sangue – São Paulo – 2012

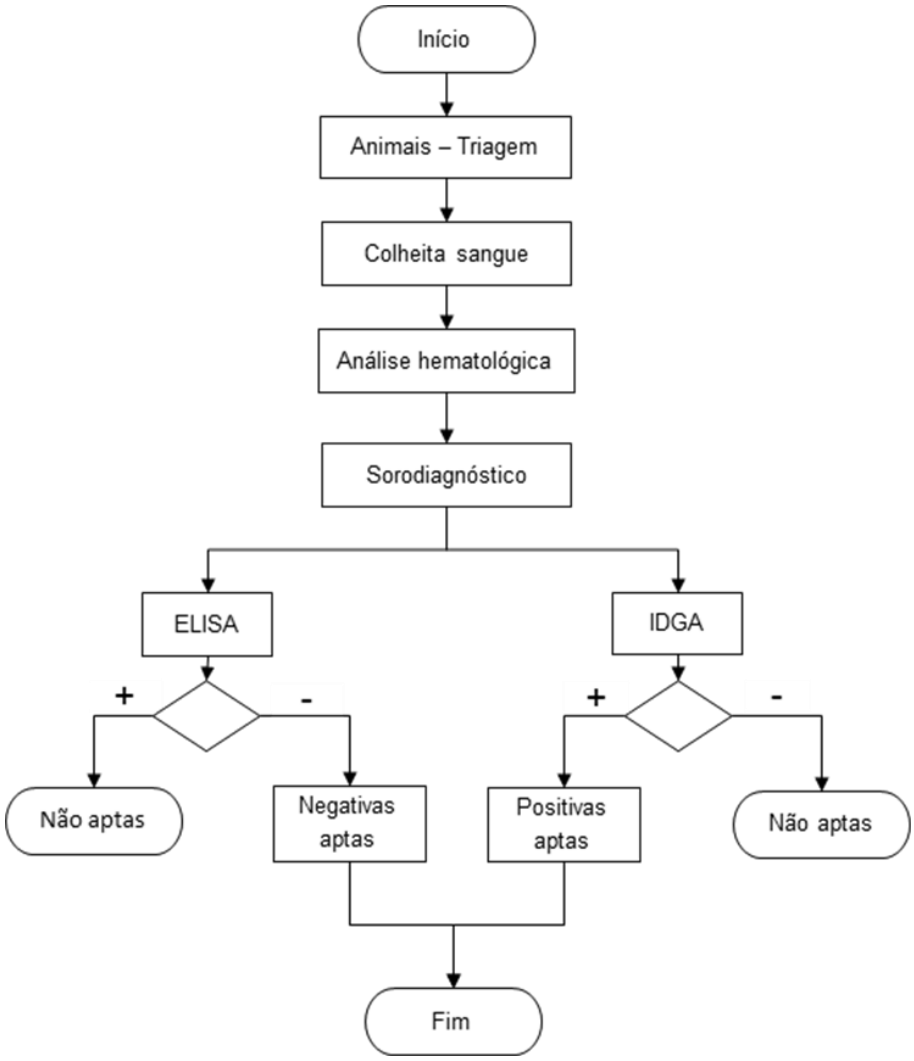
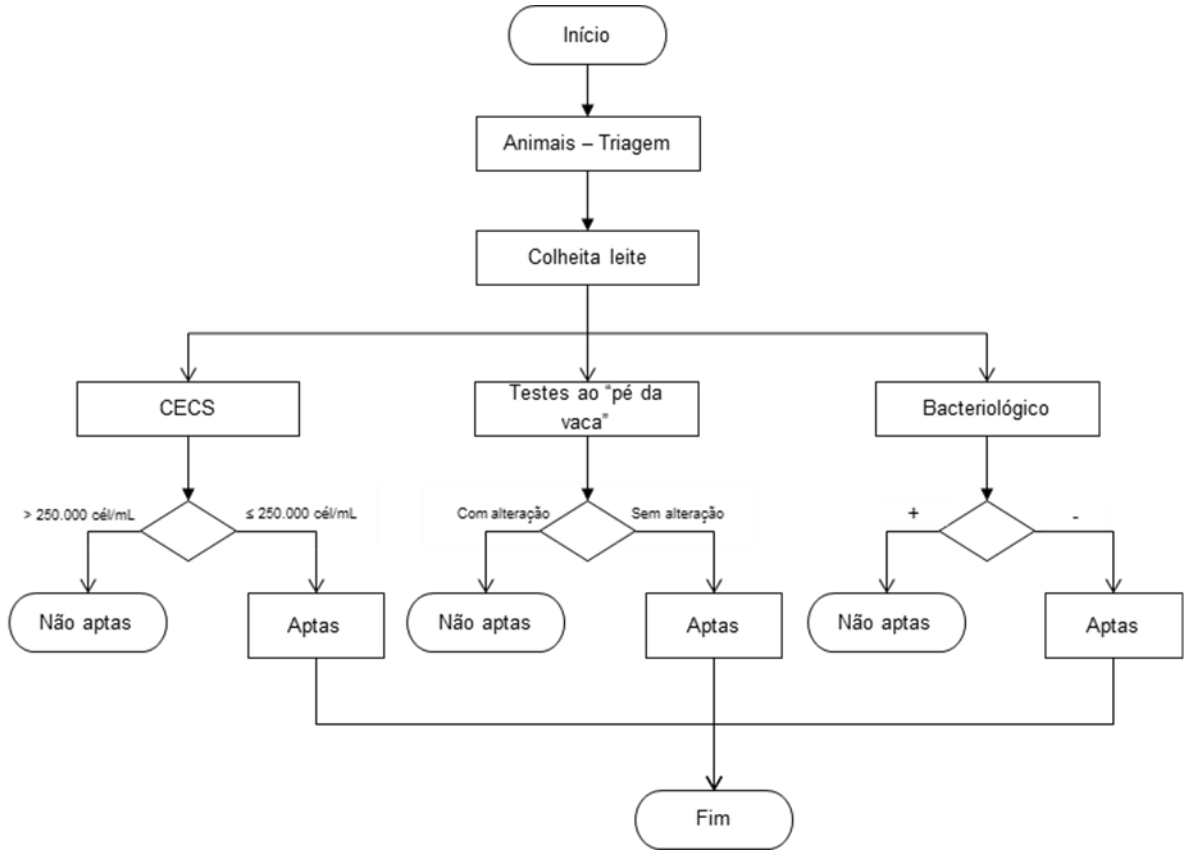


Figura 8 – Representação esquemática das etapas de triagem e formação dos grupos experimentais correlacionados ao úbere e amostras de leite – São Paulo – 2012



9.2.1 Colheita de sangue

Foram colhidas de cada um dos animais duas amostras de sangue utilizando sistema a vácuo[24], por venopunção coccígea sendo uma em tubo siliconizado, sem anticoagulante, com capacidade para até 10mL (obtenção de soro), e outra em tubo siliconizado contendo EDTA[25] dipotássico, com capacidade para até 4mL para a realização de hemograma.

Após aproximadamente 110 dias da primeira colheita, novas amostras de sangue foram colhidas para a verificação da normalidade no hemograma e

---

[24] Sistema Vacutainer® - Becton Dickinson™, San Diego, CA.

[25] *Ethylenediamine tetraacetic acid* – ácido etilenodiamino tetra-acético

identificação das vacas dos grupos N e LP, para tanto foram considerados, como referência para as contagens leucocitárias dos animais, os valores apontados por Kramer et al. (2000) e Divers e Peek (2008) sumarizados na tabela 14.

Tabela 14 – Valores do leucograma de bovinos sadios, em número absoluto e contagem diferencial relativa, utilizados como referência neste estudo – São Paulo – 2012

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

Fonte: Kramer et al. (2000); Divers e Peek (2008).

9.2.2 Sorodiagnóstico para leucose enzoótica dos bovinos

O genoma completo do VLB consiste em uma sequencia de 8.714 nucleotídeos e pode ser definida como 5'LTR-*gag-pol-env*-px-LTR 3'. O gene *gag* é altamente conservado e consiste em uma sequencia de 1.178 nucleotídeos. O gene *env* do VLB (composto por 1.493 nucleotídeos) codifica um percurssor proteico (gp72), o qual é clivado em gp51, uma proteína imunodominante que serve como alvo para anticorpos neutralizantes e em gp30 uma proteína transmembrana que será responsável pela entrada do vírus na célula (ALKAN et al., 2011)

Para a detecção dos anticorpos séricos específicos anti-VLB, foi empregada a técnica de Imunodifusão Radial Dupla de *Ouchterlony*[26] (Imunodifusão em Ágar gel – IDGA) e Kits comerciais[27] de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), utilizando o antígeno glicoproteico (gp51) extraído do envelope do vírus.

---

[26] Kit comercial contendo antígeno para diagnóstico de Leucose enzoótica dos bovinos – Laboratório TECPAR, Curitiba, PR.

[27] Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit® - VRMD, INc., Pulman, WA, USA, n° cat. 284-5.

Foram consideradas vacas positivas para LEB, aquelas diagnosticadas como sororreagentes no teste de IDGA (de maior especificidade), e negativas, aquelas apresentando diagnostico negativo no teste ELISA (de maior sensibilidade).

9.2.3 Análise hematológica

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

9.2.4 Colheita de leite

Após a realização do exame físico da glândula mamária acrescido da realização do exame da caneca de fundo escuro e do *California mastitis test* (CMT), as amostras de leite foram colhidas em duas alíquotas. A primeira foi destinada a contagem eletrônica de células somáticas (CECS) e a segunda para o exame bacteriológico.

9.2.5 Testes ao “pé da vaca”

A avaliação clínica dos animais foi realizada por meio do exame físico da glândula mamária e do exame do leite conforme Birgel (2004). Todos os quartos mamários foram avaliados por inspeção do úbere e dos tetos e palpação do parênquima, tetos e estruturas internas. Animais que apresentaram qualquer tipo de

alteração nesta avaliação foram considerados não aptos à formação dos grupos experimentais.

O leite foi avaliado imediatamente antes da colheita das amostras pelo teste de Tamis e CMT. O úbere foi higienizado por meio da imersão de cada teto em solução antisséptica e a secagem foi realizada com papel toalha individual. Após esta higienização foi realizado o teste da caneca de fundo escuro (DIRKSEN; GRUNDER; STOBER, 1993), observando-se cor, consistência e presença de massa ou grumos. Em seguida foi realizado o teste de CMT, utilizando detergente comercial específico[28] para este teste (2 mL do reagente em 2 mL de leite), observando-se a intensidade da reação (aumento da viscosidade da mistura leite e reagente) e variações do pH (SCHALM; NOORLANDER, 1957). Neste caso também os animais que apresentaram qualquer tipo de alteração na avaliação dos testes foram considerados não aptos à formação dos grupos experimentais.

9.2.6 Contagem eletrônica de células somáticas (CECS)

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

Conforme descrito anteriormente os animais que apresentaram contagem de células somáticas ≥ 250.000cél/mL em qualquer uma das quatro glândulas mamárias foram consideradas não aptos à formação dos grupos experimentais.

[28] Reativo específico, marca: Fatec®

9.2.7 Exame bacteriológico

Para o exame bacteriológico foi realizada a antissepsia do teto de acordo com o *National Mastitis Council* (OLIVER et al., 2004). As amostras de leite foram acondicionadas, em frascos estéreis específicos, sob refrigeração até a chegada no laboratório.

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

No laboratório, as amostras de leite foram congeladas para posteriormente serem semeadas em placas de *Petri* contendo meio de Agar-sangue de carneiro (ágar base[29] acrescido de 7% de sangue de carneiro) e ágar *Sabourand-dextrose*[30] e incubadas (37°C por 24 e 72 horas) (BAUER et al., 1966). Para as amostras de leite com crescimento bacteriano foi feita a identificação das bactérias por meio de provas bioquímicas (LENNETE; BALOWS; HANSLER, 1985), seguida da classificação estabelecida por Krieg e Holt (1994) e Murray et al. (1999).

Somente os animais que apresentaram cultura negativa para as quatro glândulas mamárias foram considerados aptos à formação dos grupos experimentais.

9.3 SEGUNDA FASE

Para a segunda fase deste experimento foram selecionadas quatro vacas do grupo negativo e quatro vacas do grupo LP. Nesta fase foram avaliadas as amostras de leite de cada um dos animais para a quantificação da IL-10 dos nove animais selecionados.

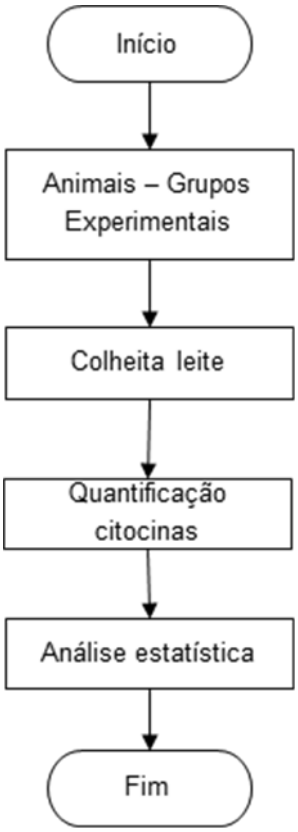
---

[6] Blood agar base – Oxoid Hampshire – U.K.

[30] Sabourand dextrose Agar – Oxoid Hampshire – U.K.

A figura 9 apresenta representação esquemática do experimento.

Figura 9 – Representação esquemática da etapa de avaliação das concentrações de citocinas – São Paulo – 2012



9.3.1 Colheita de leite

Após as avaliações da glândula mamária acrescidas do exame do próprio leite (BIRGEL, 2004) foram coletados 50 mL de leite em frascos de plástico estéril por glândula mamária de cada um dos animais inclusos nos grupos experimentais.

9.3.1.1 Quantificação de citocinas

As amostras de soro lácteo foram obtidas por meio de centrifugação do leite a 1.000 rpm por 15 minutos. Em seguida a camada de gordura formada foi removida e o soro lácteo armazenado em tubos tipo *eppendorf*[31] a -80º C até o momento do descongelamento e quantificação das citocinas (KOESS; HAMANN, 2008).

Para a determinação das quantidades lácteas da interleucina-10 (IL-10) nas amostras obtidas dos animais dos diferentes grupos experimentais foram utilizados kits comerciais de ELISA seguindo os protocolos e determinações dos fabricantes (*Interleukin-10 Human, Biotrack Easy System*[32]).

9.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises das variáveis quantitativas são apresentadas em tabelas com média, mediana, desvio-padrão, valor mínimo e máximo e P-valor. Para as comparações entre os grupos utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

O nível de significância aplicado nos testes foi de 5% ($P \leq 0,05$), sempre considerando hipóteses alternativas bicaudais.

Para tais análises, foi utilizado o *software* estatístico SPSS®, versão 18[33].

---

[31] *Eppendorf microtube* 3810

[32] GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA; n° code RPN5962

[33] SPSS® – IBM™, Chicago, IL, USA

10 RESULTADOS

Os resultados das análises das amostras tanto do sangue quanto do leite são aqui apresentados em duas etapas. Na primeira etapa estão expostos os resultados descritivos das análises de toda a população submetida aos critérios de inclusão amostral para a composição dos grupos experimentais. Na segunda etapa estão apresentados os resultados das quantificações da IL-10 no leite dos animais selecionados e inclusos em cada um destes grupos.

10.1 ANÁLISE DESCRITIVA

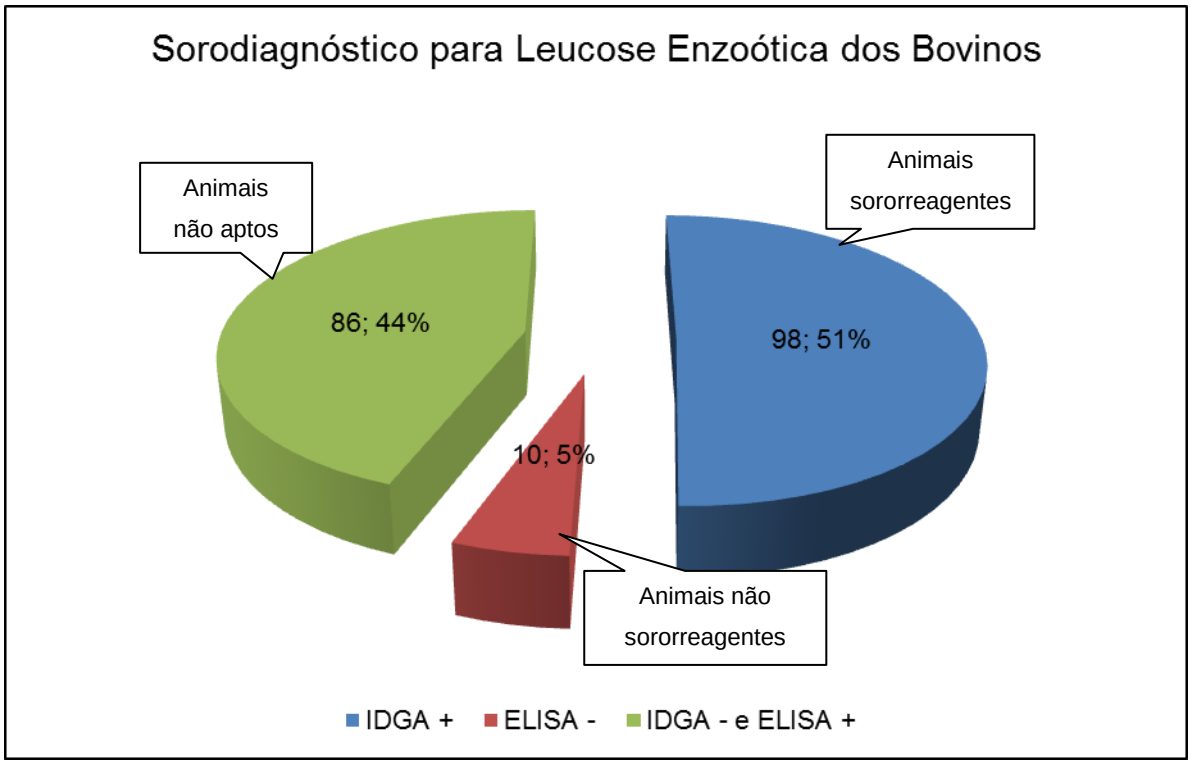
Conforme apresentado no delineamento para composição dos grupos experimentais as vacas foram submetidas a etapa de triagem, conforme segue.

10.1.1 Triagem

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

Das 194 vacas, 98 (50,50%) foram positivas e dez (5,20%) foram negativas para a pesquisa de anticorpos anti-gp51 do VLB nos testes de ELISA e IDGA. As 86 (44,30%) vacas restantes não atenderam ao critério de inclusão amostral quanto ao sorodiagnóstico, apresentando-se negativas na IDGA e positivas no ELISA.

Gráfico 13 – Distribuição dos animais avaliados durante o período de triagem de acordo com os resultados no sorodiagnóstico para leucose enzoótica dos bovinos – São Paulo – 2012



Com o objetivo de reiterar as vacas positivas ao VLB e de confirmar a soronegatividade e a normalidade do hemograma de todos os animais, após 110 dias da colheita inicial das amostras de sangue foi realizada uma segunda triagem. Foram consideradas aptas vacas negativas ou positivas, apresentando ou não, linfocitose persistente conforme critérios estabelecidos por Brener, Avidar e Lahav (2007).

Os valores das médias, desvios padrão, medianas e valores mínimo e máximo, absolutos e relativos dos leucócitos e dos linfócitos das amostras negativas e positivas para a LEB obtidas no primeiro e segundo hemograma estão expressos na tabela 15 abaixo.

Tabela 15 – Valores das médias, medianas, desvios-padrões, mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e linfócitos das amostras de sangue dos animais triados durante o estudo – São Paulo – 2012

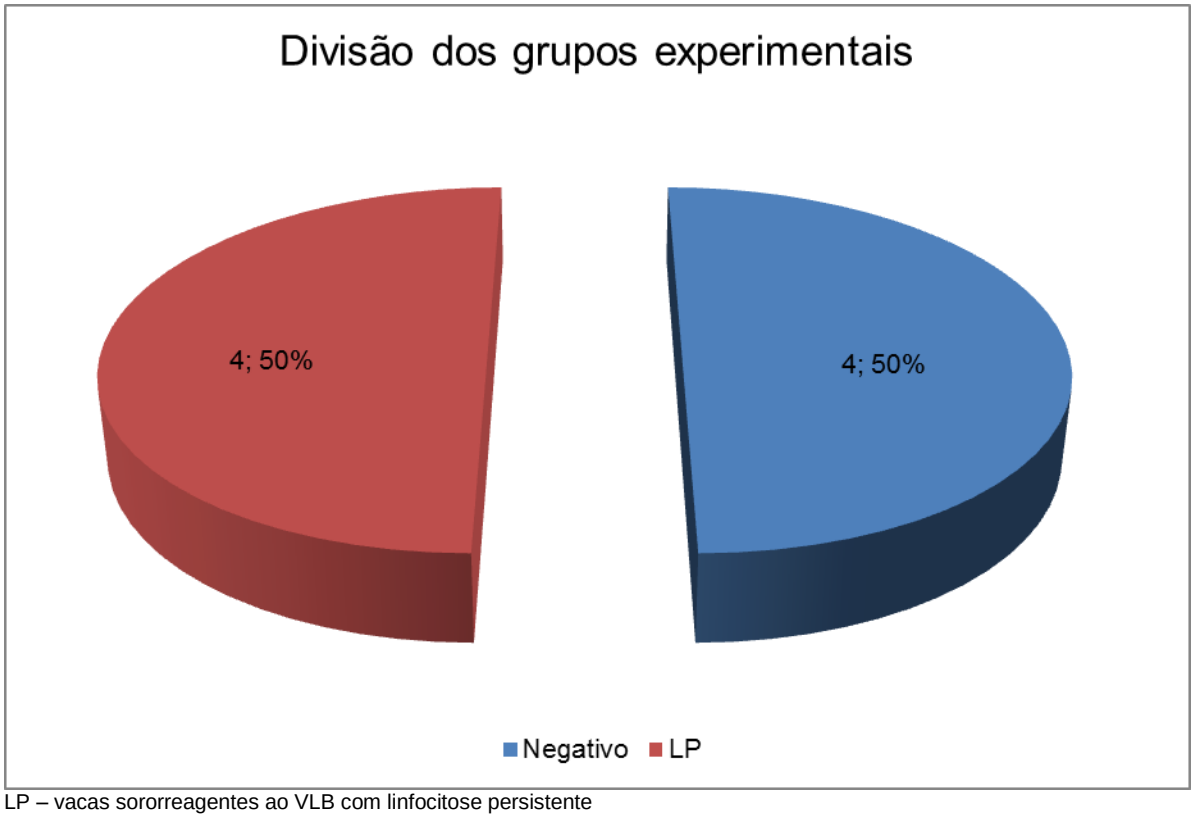
				Grupos	
				Negativo	Positivo
Primeira triagem	Valores absolutos	Leucócitos (x10³)/µL	Média	11,38	14,71
			Desvio Padrão	(±2,49)	(±7,40)
			Mediana	11,85	13,00
			(Mínimo - Máximo)	(6,90 - 15,40)	(4,10 - 49,30)
		Linfócitos (x10³)/µL	Média	7,00	10,01
			Desvio Padrão	(±2,24)	(±6,64)
			Mediana	6,78	8,52
			(Mínimo - Máximo)	(4,65 - 12,16)	(2,05 - 41,41)
	Valores relativos	Linfócitos (%)	Média	59,20	61,76
			Desvio Padrão	(± 13,24)	(±13,65)
			Mediana	61,00	63,50
			(Mínimo - Máximo)	(38,00 - 75,00)	(24,00 - 85,00)
		Linfócitos atípicos (%)	Média	2,60	3,22
			Desvio Padrão	(±1,89)	(±2,19)
			Mediana	2,50	3,00
			(Mínimo - Máximo)	(0,00 - 5,00)	(0,00 - 10,00)
Total de amostras de sangue				10	98
				Negativo	LP
Segunda Triagem	Valores absolutos	Leucócitos (x10³)/µL	Média	9,14	19,48
			Desvio Padrão	(±2,12)	(±3,40)
			Mediana	9,00	18,81
			(Mínimo - Máximo)	(5,40 - 13,10)	(14,78 - 25,62)
		Linfócitos (x10³)/µL	Média	5,72	14,59
			Desvio Padrão	(±1,43)	(±3,62)
			Mediana	5,31	14,16
			(Mínimo - Máximo)	(3,51 - 8,64)	(8,95 - 22,01)
	Valores relativos	Linfócitos (%)	Média	60,11	61,03
			Desvio Padrão	(± 10,06)	(±23,88)
			Mediana	61,00	72,10
			(Mínimo - Máximo)	(44,00 - 76,00)	(6,42 - 79,80)
		Linfócitos atípicos (%)	Média	3,00	4,36
			Desvio Padrão	(±2,12)	(±2,80)
			Mediana	3,00	5,40
			(Mínimo - Máximo)	(0,00 - 7,00)	(0,00 - 12,00)
Total de amostras de sangue				9	37

N – vacas soronegativas ao VLB
AL – vacas sororreagentes ao VLB sem linfocitose persistente
LP – vacas sororreagentes ao VLB com linfocitose persistente

10.1.1.1 Amostras de sangue

Atendidos os critérios de inclusão amostral, oito vacas foram selecionadas e alocadas nos respectivos grupos, a saber: quatro vacas negativas na pesquisa de anticorpos para o VLB (Grupo N); quatro vacas positivas com linfocitose persistente (Grupo LP).

Gráfico 14 – Divisão dos grupos experimentais negativo e LP de acordo com os resultados no sorodiagnóstico por leucose enzoótica dos bovinos – São Paulo – 2012



LP – vacas sororreagentes ao VLB com linfocitose persistente

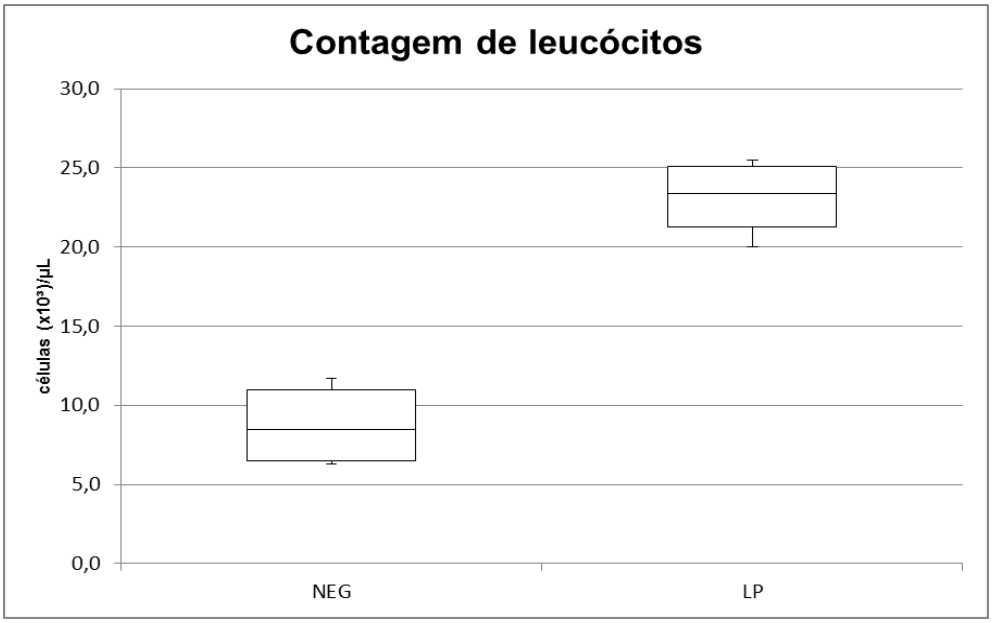
Os valores das médias, desvio-padrão, medianas e valores mínimos e máximos absolutos e relativos dos leucócitos e dos linfócitos das amostras de sangue das vacas utilizadas no experimento estão descritas na tabela 16.

Tabela 16 – Valores das médias, medianas, desvios-padrões, mínimo e máximo absolutos e relativos dos leucócitos e linfócitos das amostras de sangue das vacas utilizadas no experimento – São Paulo – 2012.

			Grupos	
			Negativo	LP
Valores absolutos	Leucócitos (x10³)/µL	Média	8,73	23,05
		Desvio Padrão	(±2,65)	(±2,64)
		Mediana	8,45	23,35
		(Mínimo - Máximo)	(6,30 - 11,70)	(20,00 - 25,50)
	Linfócitos (x10³)/µL	Média	4,63	17,09
		Desvio Padrão	(±0,94)	(±3,16)
		Mediana	4,40	17,18
		(Mínimo - Máximo)	(3,75 - 5,97)	(14,11 - 19,89)
Valores relativos	Linfócitos (%)	Média	52,25	61,00
		Desvio Padrão	(±10,59)	(±14,31)
		Mediana	51,00	60,00
		(Mínimo - Máximo)	(41,00 - 66,00)	(46,00 - 78,00)
	Linfócitos atípicos (%)	Média	2,75	12,75
		Desvio Padrão	(±0,96)	(±11,87)
		Mediana	2,50	12,50
		(Mínimo - Máximo)	(2,00 - 4,00)	(0,00 - 26,00)
Total de amostras de sangue			4	4

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

Gráfico 15– Representação dos valores dos leucócitos das amostras de sangue das vacas utilizadas no experimento – São Paulo – 2012



NEG: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

10.1.1.2 Amostras de leite

Conforme os critérios de inclusão amostral estabelecidos, todos os oito animais inclusos neste experimento apresentaram exame físico da glândula mamária com características compatíveis à úberes sadios e teste de Tamis, *California mastitis test* (CMT) e exame bacteriológico dentro dos padrões de normalidade para a espécie. A CECS foi realizada no Laboratório de Fisiologia da Lactação do Departamento de Fisiologia do Centro de Tecnologia para o Gerenciamento da Pecuária de Leite da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ-USP), Piracicaba – SP e os resultados descritivos encontram-se na tabela 17 abaixo.

Tabela 17 – Resultados médios, medianos, desvios-padrão, mínimo e máximo (CCS/mL) das quantidades de células somáticas verificadas nas 8 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2012

		Grupos	
		Negativo	LP
CCS	Média	37.125	44.583
	Desvio Padrão	(±42.456)	(±61.601)
	Mediana	18.000	15.500
	(Mínimo - Máximo)	(2.000 - 131.000)	(1.000 - 208.000)
Total de amostras		16	16

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

10.1.2 Perfil lácteo de IL-10

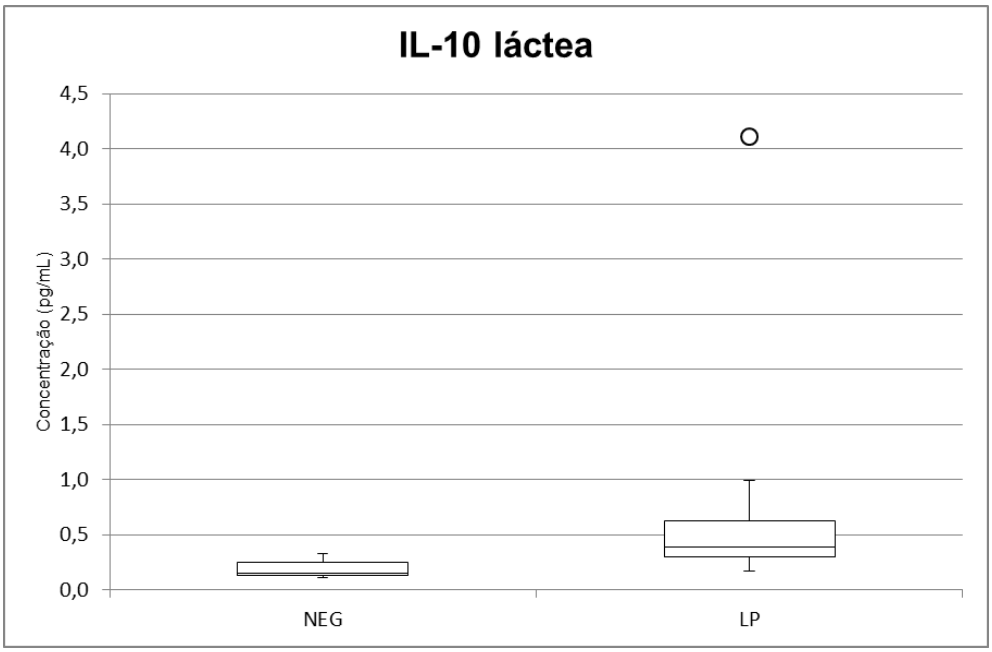
As concentrações lácteas de IL-10 foram mensuradas empregando-se kits comerciais para ELISA. Os resultados obtidos são apresentados na forma de média, mediana, desvios-padrões, valores mínimos e máximos e P-valor para cada grupo experimental na tabela 18 abaixo.

Tabela 18 – Resultados médios, mediana, desvio-padarão, mínimo, máximo (pg/mL) e valor de P das quantidades lácteas de IL-10 verificadas nas 8 vacas da raça Holandesa Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2012.

		Grupos		P-valor
		Negativo	LP	
IL-10	Média	0,19	0,69	0,0002
	Desvio-padrão	(± 0,10)	(± 0,95)	
	Mediana	0,15[a]	0,39[b]	
	Mínimo – Máximo	(0,12 - 0,46)	(0,17 - 4,12)	
	n	16	16	

LP: vacas sororeagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente
Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre as colunas (P≤0,05)

Gráfico 16 – Representação gráfica da IL-10 nos grupos experimentais – São Paulo – 2012



NEG: vacas soronegativas ao antígeno gp51 do vírus da LEB
LP: vacas sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da LEB com linfocitose persistente

Pode-se observar que houve diferença estatisticamente significante a 5% entre os grupos Negativo e LP (P=0,0002). Sendo as concentrações de IL-10 no grupo LP foram significativamente maiores do que as do grupo Negativo (mediana de 0,39 pg/mL e 0,15 pg/mL, respectivamente).

11 DISCUSSÃO

11.1 TRIAGEM

Com o intuito de investigar possíveis interferências que a LEB possa causar aos principais sistemas imunitários da glândula mamária de animais naturalmente infectados, o presente estudo buscou homogeneizar os grupos para não tendenciar variações causadas por outros fatores de estimulação que não fossem a presença do vírus propriamente dita, como diferenças no manejo dos animais, sejam elas comportamentais, nutricionais, edafoclimáticas, sanitárias ou outras.

Duas propriedades produtoras de leite localizadas na região nordeste do estado de São Paulo foram avaliadas e 194 vacas submetidas a um relativamente longo período de triagem (aproximadamente quatro meses). Depois de verificados e atendidos todos os critérios de inclusão estabelecidos e descritos no capítulo de material e métodos desta dissertação, foi possível a seleção de oito animais distribuídos de forma igualitária em dois grupos, a saber: negativos e sororreagentes manifestando linfocitose persistente (LP), para a quantificação das concentrações de IL-10 nas amostras de soro lácteo.

Consideraram-se negativas para a LEB as vacas não sororreagentes no teste de ELISA, e positivas as sororreagentes no teste de IDGA. Esta estratégia não traz grandes novidades, porém difere de outros estudos onde o diagnóstico para a LEB procedeu-se exclusivamente por IDGA. O emprego destas técnicas associadas já vem sendo utilizada por esta equipe a algum tempo visando evitar resultados falso-negativos e falso-positivos (AZEDO, 2010; SOUZA, 2010; BLAGITZ, 2011).

O índice de prevalência da doença encontrado durante este estudo foi de 50,50%, valor que não difere de outros relatos de pesquisadores que utilizaram a mesma técnica de sorodiagnóstico (IDGA), em rebanhos leiteiros brasileiros tecnificados (BIRGEL JUNIOR et al., 1995; AZEDO, 2010; BLAGITZ, 2011). Já o índice de animais manifestando linfocitose persistente foi de 24,32% do total de animais positivos avaliados durante a triagem, este valor também ficou próximo aos encontrados por outros pesquisadores desta equipe, e não diferem de vários outros

relatados que sugerem que até 33% dos animais acometidos manifestarão este *status* ao longo de suas vidas (SCHWARTZ; LEVY, 1994; STÖBER, 2005; MORATORIO et al., 2010; INOUE et al., 2011; ERKISNE et al., 2012).

Ressalta-se neste cenário que a forte pressão de seleção dos animais imposta para este estudo anula em parte um dos principais efeitos cogitados para o VLB no que tange o aumento da susceptibilidade dos bovinos infectados a outras enfermidades, inclusive a mastite, cuja estreita relação com a LEB já foi descrita por Rinaldi, Li e Capuco (2010).

Dados não publicados obtidos por este grupo apontam a mastite como uma importante variável de confusão na leitura da sinalização realizada pelas citocinas em animais sororreagentes ou não ao VLB. Testes estatísticos hierarquizados sugerem significativa diferença no perfil de citocinas estudado quando a mastite não foi eliminada da amostra.

Fatos como estes justificam a opção de trabalho com um “n” reduzido porém sem a presença desta variável de confusão nas amostras estudadas.

Outro ponto a ser considerado neste sentido é que se tratarmos cada um dos quartos mamários como entidades isoladas, como sugerido por Sordillo, Shafer-Weaver e De Rosa (1997), o valor prático do “n” para as avaliações lácteas realizadas seria de 16 e 16 para os grupos Negativo e LP, respectivamente.

Vale frisar que o efeito da individualidade dos animais não seria amenizado por esta linha de raciocínio.

Para este estudo, como citado anteriormente, a proposta centrou-se fielmente sobre a avaliação da resposta imunitária na presença do VLB minimizados outros fatores ou estímulos controláveis ao sistema imune dos animais.

11.2 PERFIL DE CITOCINAS

11.2.1 Perfil Lácteo da IL-10

Uma das teorias que se propõem esclarecer a gênese da linfocitose persistente (LP) nos animais acometidos pelo VLB baseia-se sobre a afirmação de que uma mudança no padrão da resposta imune celular (Th1) para humoral (Th2) possa estar envolvida com a progressão da enfermidade (PYEON; O'REILLY; SPLITTER, 1996).

A IL-10, uma citocina de perfil Th2 tida como imunomoduladora por sua ação preponderante na inibição da síntese de citocinas de padrão pró-inflamatório (Th1), e ativa influência na modificação do perfil da resposta imune celular para humoral, aparentemente possui a capacidade de promover esta transformação de perfil de citocinas liberadas durante diferentes fases da infecção pelo VLB (THOMPSON-SNIPES et al., 1991; VARELLA; FORTES, 2001; MITELMAN et al., 2009; HARTOG et al., 2011).

Neste sentido vários autores como Trueblood et al. (1998) defendem que a IL-10, assim como a IL-2, IL-4 e IFN-γ atuam de forma sinérgica e isolada para promover a ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B, grupo celular de predileção do vírus e que está diretamente envolvido no estabelecimento dos quadros de linfocitose persistente.

Tal fato pôde ser observado com relação aos resultados reportados por Konnai et al. (2003) e Amills et al. (2004) que observaram aumento de citocinas de padrão Th2 como a IL-10 e a IL-4 em amostras de soro sanguíneo de animais positivos para o VLB.

Azedo (2010) também verificou que as concentrações séricas médias de IL-10 em amostras sanguíneas de animais manifestando LP foram maiores do que aquelas observadas em animais alinfocitóticos ou negativos para a LEB.

Da mesma forma, Yakobson et al. (1998) apontam que uma predominante perda da expressão de citocinas ligadas a resposta imune celular e a rápida mudança para expressão de citocinas ligadas a resposta imune humoral (IL-10) é

característica em animais positivos que desenvolvem *status* de LP rapidamente após a infecção experimental de bezerros holandeses. Outros autores como Pyeon, O'Reilly e Splitter (1996) e Trueblood et al. (1998) também encontraram este comportamento quanto as concentrações de IL-10 em animais sororreagentes em relação aos negativos, porém os testes laboratoriais nestes casos mensuravam a expressão de RNAm de IL-10 em células B provenientes de vacas infectadas pelo VLB estimuladas *in vitro* com Con-A e em macrófagos, respectivamente.

Como se pode observar nos relatos descritos acima há razoável consenso quanto ao aumento das concentrações de IL-10 no sangue de animais sororreagentes para LEB manifestando LP, porém dados científicos demonstrando a mensuração de IL-10, ou mesmo de outras citocinas, diretamente sobre o soro lácteo de bovinos positivos para LEB parecem bastante escassos e não foram localizados durante o desenvolvimento deste estudo.

É sabido que as células epiteliais, macrófagos e leucócitos residentes da glândula mamária são importantes produtores de citocinas (OVIEDO-BOYSO et al., 2007). McClenahan, Sotos e Czuprynski (2005) inclusive sugere que o número absoluto de células epiteliais encontrados na glândula mamária daria a estas o potencial de serem as principais contribuintes na produção de citocinas contidas no leite e no soro de vacas com mastites experimentalmente induzidas ou naturalmente adquiridas. Todavia ainda não está claro se estas células realmente possuem tal capacidade e de que maneira isto aconteceria.

No presente estudo, verificou-se que as medianas das concentrações no soro lácteo de IL-10 dos animais pertencentes ao grupo LP foram significativamente maiores do que aquelas observadas nos animais pertencentes ao grupo negativo (0,39 pg/mL e 0,15 pg/mL, respectivamente (P=0,0002)).

Tais concentrações de IL-10 presentes no soro lácteo verificadas neste estudo foram obtidas por meio da utilização de kit comercial ELISA *Interleukin-10 Human, Biotrack easy system*[34]. Este kit para a espécie humana pôde ser utilizado com segurança uma vez que a IL-10 humana apresenta grau de homologia acima de 60% (76,8%), como sugerido por Scheerlink (1999), com a IL-10 bovina.

Enfim, neste estudo verificou-se que as concentrações lácteas de IL-10 em vacas sororreagentes para LEB manifestando linfocitose persistente, obtidas por

---

[34] GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA; n°. code RPN5962

meio de teste ELISA desenvolvido para amostras humanas, foram maiores do que aquelas observadas em animais negativos para a doença, sugerindo que está citocina possa realmente atuar no estabelecimento deste quadro de LP na glândula mamária dos animais infectados pelo VLB.

12 **CONCLUSÕES**

Baseado nos métodos aplicados, este estudo possibilitou a constatação de que vacas naturalmente infectadas pelo VLB apresentam alterações correlacionadas ao perfil de citocinas que podem influenciar no sistema imunológico como causa ou consequência da LEB. Os resultados e discussões apontados neste estudo permitem as seguintes conclusões:

a. As concentrações séricas de citocinas mensuradas não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais estudados, sugerindo que o diminuto “n” disponível e o alto coeficiente de variação provenientes deste entrave possam ter sido suficientes para anular alguns dos possíveis achados quanto às apresentações clínicas da LEB.

b. As concentrações lácteas das citocinas IL-1β, IL-4, TNF-α e IFN-γ, mensuradas neste estudo apresentaram comportamentos semelhantes aos habitualmente reportados na literatura para soro sanguíneo, sugerindo que a atuação do VLB sobre a glândula mamária promova respostas análogas às observadas sistemicamente.

c. As concentrações lácteas de IL-10 em animais sororreagentes para LEB e manifestando *status* de LP são maiores do que aquelas encontradas nos animais não sororreagentes, sugerindo, ou até mesmo, reiterando, uma possível ação do VLB sobre as células da glândula mamária no sentido de determinar uma resposta Th2 predominante.

d. As concentrações séricas de IL-1β e TNF-α são habitualmente maiores do que aquelas encontradas no soro lácteo.

e. No presente estudo, e com base nos métodos aplicados, não houve contribuição dos grupos experimentais para possíveis diferenças entre as concentrações de citocinas no sangue e no leite.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 545 p.

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, p. 787-793, 1996.

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

ALKAN, F.; OĞUZOĞLU, T. Ç.; TIMURKAN, M. O.; KARAPMAR, Z. Characterisation of *env* and *gag* gene fragments of bovine leukemia virus (BLVs) from cattle in Turkey. **Archives of Virology**, v. 156, p. 1891-1896, 2011.

ALLUWAIMI, A. M. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy**. Research in Veterinary Science,** v. 77, p. 211-222, 2004.

ALLUWAIMI, A. M.; LEUTENEGGER, C. M.; FARVER, T. B.; ROSSITTO, P. V.; SMITH, W. L.; CULLOR, J. S. The cytokines markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. **Journal of Veterinary Medicine Series B-infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 50, p. 105-111, 2003.

ALTREUTHER, G.; LLAMES, L.; NEUENSCHWANDER, S.; LAGHANS, W.;WERLING, D. Morphologic and functional changes in bovine monocytes infected *in vitro* with the bovine leukaemia virus. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 54, n. 5, p. 459-469, 2001.

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

AMILLS, M.; RAMIYA, V.; NORIMINE, J.; OLMSTEAD, C. A.; LEWIN, H. A. Reduced IL-2 and IL-4 mRNA expression in CD4+ T cells from bovine leukemia virus-infected cows with persistent lymphocytosis. **Virology**, v. 304, p. 01-09, 2002.

ARAUJO, D. K. G.; GHELLER, V. A. Aspectos morfológicos, celulares e moleculares da imunidade da glândula mamária de búfalas (*Bubalus bubalis*): revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal,** v. 29, n. 2, p. 77-83, 2005.

ASADPOUR, R.; JAFARI, R. Detection of bovine leukosis provirus in blood and semen samples of bulls. **Comparative Clinical Pathology**, v. 21, n. 2, p. 187-191, 2010.

ASSAI, K.; KAI, K.; RIKIINSHI, H.; SUGAWARA, S.; MARUYAMA, Y.; YAMAGUCHI, T.; OHTA, M.; KUMAGAI, K. Variation in CD4+ T and CD8+ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretion during lactating and non-lactating periods. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 65, 51-61, 1998.

AZEDO, M. R. **Influência do vírus da leucose bovina na resposta imunitária de animais naturalmente infectados.** 2010. 161 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

AZEDO, M. R.; MASSOCO, C. O.; BLAGITZ, M. G.; SOUZA, F. N.; BATISTA, C. F.; SAKAI, M.; SÁ-ROCHA, L. C.; KFOURY JUNIOR, J. R.; STRICAGNOLO, C. R.; BENESI, F. J.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Influência da leucose enzoótica bovina na função fagocítica de leucócitos circulantes em animais manifestando linfocitose persistente. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 390-397, 2008.

BANNERMAN, D. D. Pathogen-dependent induction of cytokines and other soluble inflammatory mediators during intramammary infection of dairy cows. **Journal of Animal Sciences**, v. 87, p. 10-25, 2009.

BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; LEE, J. W.; ZHAO, X.; HOPE, J. C.; RAINARD, P. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 463-472, 2004.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibilidad tests by standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BIRGEL JUNIOR, E. H.; D'ANGELINO, J. L.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos, em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 15, p. 93-99, 1995.

BIRGEL, E. H. Semiologia da glândula mamária de ruminantes. In: FEITOSA, F. L. F. (Ed.). **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 1° edição. São Paulo: Editora Roca, 2004.

BLAGITZ, M. G. **Avaliação funcional dos fagócitos sanguíneos e lácteos de vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos**. 2011. 161 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BLECHA, F. Cytokines: applications in domestic animals. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 328-329, 1991**.**

BORDEN, E. C. Pleiotropic cellular modulators. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 62, p. 18-24, 1992.

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

BROWN, W. C.; RICE-FICHT, A. C.; ESTES, A. C.; ESTES, D. M. Bovine type 1 and type 2 responses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 63, p. 45-55, 1998.

BURDIN, N.; KOOTEN, C. V.; GALIBERT, J.; ABRAMS, S.; WIJDENES, Y.; BANCHEREAU, Y.; ROUSSETT, F. Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40 activated human B lymphocytes. **Journal of Immunology**, v. 154, p. 2533- 2544, 1995.

BURTON, A. B.; WAGNER, B.; ERB, H. N.; AINSWORTH, D. M. Serum interleukin-6 (IL-6) and IL-10 concentrations in normal and septic neonatal foals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, p. 122-128, 2009.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K. Innate immunity of the bovine mammary gland: Response to infection. **Imunidade inata da glândula mamária bovina: Resposta à infecção,** v. 39, n. 6, p. 1934-1943, 2009. ISSN 01038478. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-70349582345&partnerID=40&md5=0996416d7edfcb90283f601ef904ac2d>. Acesso em 06 jan. 2012.

CHASE, C. C. L.; HURLEY, D. J.; REBER, A. J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response**. Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 24, p. 87-104, 2008.

CICCARESE, S.; LANAVE, C.; SACCONE, C.ll Evolution of T-cell receptor gamma and delta constant region and other T-cell-related proteins in the human-rodent-artiodactyl triplet. **Genetics**, v. 145, p. 409-419, 1997.

CLERICI, M.; BALOTTA, C.; MERONI, L., FERRARIO, E., RIVA, C., TRABATTONI, D., RIDOLFO, A., VILLA, M., SHEARER, G. M., MORONI, M., GALLI, M. Type 1 cytokine production and low prevalence of viral isolation correlate with long-term nonprogression in HIV infection. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 12, p. 1053-1061, 1996.

COHEN, S.; BIGAZZI, P. E.; YOSIGAHIDA, T. Cytokine: more than a new word, a new concept proposed by Stanley Cohen thirty years ago. **Cytokine**, v. 28, p. 242-247, 2004.

COLTMAN, D. W.; WILSON, J. G.; PILKINGTON, J. G.; STEAR, M. J.; PEMBERTON, J. M. A microsatellite in the gamma interferon gene is associated with resistance to gastrointestinal nematodes in a naturally-parasitized population of Soay sheep. **Parasitology**, v. 122, p. 571-582, 2001.

DA, Y.; SHANKS, R. D.; STEWART, J. A.; LEWIN, H. A. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 6538-6541, 1993.

DE, MAEYER.; DE, MAEYER-GUINARD, J. Interferon-gama. **Current Opinion in Immunology**, v. 4, p. 321-326, 1992.

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

DERNFALK, J.; PERSSON WALLER, K.; JOHANNISSON, A. The xMAP™ technique can be used for detection of the inflammatory cytokines IL-1β, IL-6 and TNF-α in bovine samples. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 118, n. 1-2, p. 40-49, 2007. ISSN 01652427. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-34250789098&partnerID=40&md5=43a2a4e76c5b32f4747dee57c8bc633c>. Acesso em 23 jul. 2011.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**. v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1989.

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

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

ELSE, K. J.; FINKELMAN, F. D. Intestinal nematodes parasites, cytokines and effector mechanisms. **International Journal of Parasitology**, v. 1145-1158, 1998.

ERSKINE, R. J.; BARTLETT, P. C.; BYREM, T. M.; RENDER, C. L.; FEBVAY, C.; HOUSEMAN, J. T. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 727-734, 2012.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2004. 1162 p.

FLORINS, A.; BOXUS, M.; VANDERMEERS, F.; VERLAETEN, O.; BOUZAR, A. B.; DEFOICHE, J.; HUBAUX, R.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: A rationale for host susceptibility to disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 125, n. 1/2, p. 1-7, 2008.

GOFF, J. P.; NAITO, Y.; KEHRLI JR, M. E.; HAYES, P.; DALEY, M. Physiologic effects of administration of interleukin 1 beta in cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 1983-1987, 1992.

GONÇALVES, T. O.; COSTA, D.; BRODSKYN, C. I.; DUARTE, P. M.; CÉSAR NETO, J. B.; NOGUEIRA-FILHO, G. Release of cytokines by stimulated peripheral blood mononuclear cells in chronic periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 55, p. 975-980, 2010.

GORCZYNSKI, R.; STANLEY, J. **Imunologia clínica.** Rio de Janeiro: Reichmann e Affonso Editores, 2001. 355p..

GUPTA, P. K.; BIND, R. B.; WALUNJ, S. S.; SAINI, M. High nucleotide and amino acid sequence similarities in tumor necrosis fator-α amongst Indian buffalo (*Bubalis bubalis*), Indian cattle (*Bos indicus*) and other ruminants. **European Journal of Immunogenetics**, v. 31, p. 89-193, 2004.

GUTIÉRREZ, G.; ALVAREZ, I.; POLITZKI, R.; LOMÓNACO, M.; SANTOS, M. J. D.; RONDELLI, F.; FONDEVILA, N.; TRONO, K. Natural progression of bovine leukemia virus infection in Argentinean dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 151, p. 255-263, 2011.

HAGIWARA, K.; DOMI, M.; ANDO, J. Bovine colostral CD8-positive cells are potente IFN-γ producing cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 124, p. 93-98, 2008.

HAGIWARA, K.; KATAOKA, S.; YAMANAKA, H.; KIRISAWA, R., IWAI, H. Detection of cytokines in bovine colostrum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 76, p. 183-190, 2000.

HARTOG, G. D.; SAVELKOUL, H. F. J.; SCHOEMAKER, R.; TIJAAR, E.; WESTPHAL, A. H.; RUITER, T.; WEG-SCHRIJVER, E. V.; JOOST VAN NEERVEN, R. J. Modulation of human immune responses by bovine interleukin-10. **PLOS Medicine**, v. 6, p. 1-10, 2011.

HENNING, D.; NIELSEN, K. Cross-reactivity of monoclonal antibodies to bovine immunoglobulins with immunoglobulins of other species. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 34, n. 3-4, p. 235-243, 1992. ISSN 01652427. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0026489148&partnerID=40&md5=9bf6260e3f750415a6f27e5fe3333311>. Acesso em 23 jul. 2011.

HISAEDA, K.; HAGIWARA, K.; EGUCHI, J.; YAMANAKA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha levels in sera and whey of cattle with naturally occurring coliform mastitis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, p. 1009-1011, 2001.

HUYNH, H. Y.; ROBITAILLE, G.; TURNER, J. D. Establishment of bovine mammary epithelial cell (MAC-T): and *in vitro* model for bovine lactation. **Experimental Cell Research**, v. 197, p. 191-199, 1991.

INOUE, E.; MATSUMURA, K.; MAEKAWA, K.; NAGATSUKA, K.; NOBUTA, M.; HIRATA, M.; MINAGAWA, A.; OSAWA, Y.; OKAZAKI, K. Genetic heterogeneity among bovine leukemia viroses in Japan and their relationship to leukemogenicity. **Archives of Virology**, v. 156, p. 1137-1141, 2011.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia:** O sistema imune na saúde e na doença, 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002, 767p.

JULIARENA, M. A.; POLI, M.; CERIANI, C.; SALA, L.; RODRÍGUEZ, E.; GUTIERREZ, S.; DOLCINI, G.; ODEON, A.; ESTEBAN, E. N. Antibody response against three widespread bovine viruses is not impaired in Holstein cattle carrying bovine leukocyte antigen *DRB3.2* alleles associated with bovine leukemia virus resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 375 – 381, 2009.

KABEYA, H.; FUKUDA, A.; OHASHI, K.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Tumor necrosis factor α and its receptors in experimentally bovine leukemia virus-infected sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 129-139, 2001.

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

KABEYA, H.; OHASHI, K.; OYUNBILEG, N.; NAGAOKA, Y.; AIDA, Y.; SUGIMOTO, C.; YOKOMIZO, Y.; ONUMA, M. Up-regulation of tumor necrosis factor alpha mRNA is associated with bovine leukemia virus (BLV) elimination in the early phase of infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, p. 255-265, 1999.

KEEFE, R. G.; CHOI, Y.; FERRICK, D. A.; STOTT, J. L. Bovine cytokine expression during different phases of bovine leukemia virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, p. 39-51, 1997.

KEEFE, R. G.; FERRICK, D. A.; STOTT, J. L. Cytokine transcription in lymph nodes of cattle in different stages of bovine leukemia virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**,v. 59, p. 271-283, 1997.

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

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

KONNAI, S.; USUI, T.; IKEDA, M.; KOHARA, J.; HIRATA, T.; OKADA, K.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Tumor necrosis factor-alpha up-regulation in spontaneously prolifarating cells derived from bovine leukemia virus-infected cattle. **Archives of Virology**, v. 151, p. 347-360, 2006.

KONNAI, S.; USUI, T.; OHASHI, K.; ONUMA, M.The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 283-294, 2003.

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

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

KUNKEL, S. L.; STRITER, R. M.; CHENSUE, S. W.; CAMPBELL, D. G.; REMICK, D. G. The role of TNF in diverse pathologic processes. **Biotherapy**, v. 3, p.135-141, 1991.

LAHOUASSA, H.; MOUSSAY, E.; RAINARD, P.; RIOLLET, C. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Cytokine**, v. 38, p. 12-21, 2007.

LAM, H. S.; NG, P. C. Biochemical markers of neonatal sepsis. **Pathology**, v. 40, p. 141-148, 2008.

LE, H. V.; RAMANATHAN, L.; LABDON, J. E.; MAYS-ICHINCO, C. A.; SYTO, R.; ARAI, N. Isolation and characterization of multiple variants of recombinant human interleukin 4 expressed in mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 10817-10823, 1988.

LEE, J. W.; BANNERMAN, D. D.; PAAPE, M. J.; HUANG, M. K.; ZHAO, X. Characterization of cytokine expression in milk somatic cells during intramammary infections with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* by real-time PCR. **Veterinary Research**, v. 37, p. 219-229, 2006.

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

LEQUIN, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Clinical Chemistry,** v. 51, n. 12, p. 2415-2418, 2005. ISSN 00099147. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-28044462393&partnerID=40&md5=3dede21a4d3d6b6fee91556ff391f7e5>. Acesso em 13 abr. 2012.

LEUTNEGGER, C. M.; ALLUWAIMI, A. M.; SMITH, W. L.; PERANI, L.; CULLOR, J. S. Quantitation of bovine cytokine mRNA in milk cells of healthy cattle by real-time TaqMan® polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, p. 275-287, 2000.

LEUZZI JUNIOR, L. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, p. 211-221, 2001.
LIEW, F. Y. Th1 and Th2 cells: a historical perspective. **Nature Reviews**, v. 2, p. 55-59, 2002.

LUNDBERG, P.; SPLITTER, G. A. γδ+ T-lymphocyte cytotoxicity against envelope-expressing target cells is unique to the alymphocytic state of bovine leukemia virus infection in the natural host. **Journal of Virology**, v. 74, n. 18, p. 8299-8306, 2000.

MAC EWAN, D. J. TNF receptor subtype signaling: differences and cellular consequences. **Cell Signal**, v. 14, p. 477-492, 2002.

MARTINS, L. A. **Expressão e ações da IL-4 no tecido retiniano de ratos:** vias de sinalização envolvidas. 2009. 86 f. (Mestrado). Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.

MC CLENAHAN, D. J.; SOTOS, J. S.; CZUPRYNSKI, C. J. Cytokine response of bovine mammary gland epithelial cells to *Escherichia coli*, coliform culture filtrate, or lipopolysaccharide. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 1590-1597, 2005.

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

MITELMAN, A. K.; BUCCHERI, V.; PRACCHIA, L. F.; RUBENS, C. V.; POPPE, S.; CAVALCANTE, A. M. M. P.; MONTEIRO, S. M. Quantificação das citocinas séricas Th1/Th2 por citometria de fluxo no linfoma de Hodgkin clássico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n.4, p. 260-266, 2009.

MOND, J. J.; CARMAN, J.; SARMA, C.; OHARA, J.; FINKELMAN, F. D. Interferon-γ suppresses B cell stimulation factor (BSF-1) induction of class II MHC determinants on B cells. **The Journal of Immunology**, v. 137, p. 3534-3537, 1986.

MONNERET, G.; FINCK, M. E.; VENET, F. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocytes HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. **Immunology Letters**, v. 95, p. 193-198, 2004.

MOORE, B. R. Clinical application of interferon in large animal medicine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, p. 1711-1715, 1996.

MORATORIO, G.; OBAL, G.; DUBRA, A.; CORREA, A.; BIANCHI, S.; BUSCHIAZZO, A.; CRISTINA, J.; PRITSCH, O. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viroses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. **Archives of Virology**, v. 155, p. 481-489, 2010.

MURAKAMI, H.; YAMADA, T.; SUZUKI, M.; NAKAHARA, Y.; SUZUKI, K.; SENTSUI, H. Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia. **Virus Research**, v. 156, p. 107-112, 2011.

MURAKAMI, K.; SENTSUI, H.; INOSHIMA, Y.; INUMARU, S. Increase in γδ T cells in the blood of cattle persistently infected with Bovine Leukemia Virus following administration of recombinant bovine IFN-γ. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 101, p. 61-71, 2004.

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

O'SHEA, J. J.; MA, A.; LIPSKY, P. Cytokines and autoimmunity. **Nature reviews**, v. 2, p. 37-45, 2002.

ODBILEG, R.; LEE, S. I.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Cloning and sequence analysis of llama (*lama glama*) Th2 (Ll-4, Ll-10 and Ll-13) cytokines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, p. 145-153, 2005.

OHTSUKA, H.; KUDO, K.; MORI, K.; NAGAI, F.; HATSUGAYA, A.; TAJIMA, M.; TMAURA, K.; HOSHI, F.; KOIWA, M.; KAWAMURA, S. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, p. 675-678, 2001.

OKADA, H.; ITO, T.; OHTSUKA, H.; KIRISAWA, R.; IWAI, H.; YAMASHITA, K.; YOSHINO, T.; ROSOL, T. J. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 on cryopreserved bovine mammary epithelial cell *in vitro*. **Journal of Veterinary Medicine Science**,v. 59, p. 503-507, 1999.

OLIVEIRA, S. C.; HARMS, J. S.; RECH, E. L.; RODARTE, R. S.; BOCCA, A. L.; GOES, A. M.; SPLITTER, G. A. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of intracelular bacterial infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 77-84, 1998.

OLIVER, S.P.; GONZÁLEZ, R.N.; HOGAN, J.S.; JAYARAO, B.M.; OWENS, W.E. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality.** 4 ed. Verona, WI: National Mastitis Council. 2004. 47p.

OLSSON, N.; TAUB, D. D.; NILSSON, G. Regulation of mast cell migration by Th1 and Th2 cytokines: Identification of tumor necrosis factor-α and IL-4 as mast cell chemotaxins. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, p. 267-272, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAUDE ANIMAL. **Enzootic bovine leukosis:** OIE Terrestrial Manual, p. 729-738, 2008.

OVIEDO-BOYSO, J.; VALDEZ-ALARCÓN, J. J.; CAHERO-JUÁREZ, M.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E.; BRAVO-PATIÑO, A.; BAIZABAL-AGUIRRE, V. M. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. **Journal of Infection**, v. 54, p. 399-409, 2007.

PARADIS, M. R. Update on neonatal septicemia. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 10, p. 109-135, 1994.

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

PAUL, W. E.; SEDER, R. A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell**, v. 76, p. 241-251, 1994.

PEDERSEN, L. G.; CASTELRUIZ, Y.; JACOBSEN, S.; AASTED, B. Identification of monoclonal antibodies that cross-react with cytokines from different animal species. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 88, n. 3-4, p. 111-112, 2002. ISSN 01652427. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037174249&partnerID=40&md5=cfdbf8f3f8e34a5d274057a5a1943f41>. Acesso em 23 dez. 2011.

PELI, A.; SCAGLIARINI, A.; BRITTI, D.; BOARI, A. Detection of proinflammatory and regulatory cytokines in bovine milk using RT-PCR. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 779-781, 2003.

PERSSON WALLER, K.; COLDITZ, I. G.; LUN, S.; ÖSTENSSON, K. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 74, p. 31-36, 2003.

PETERSON, K. E.; HUGHES, S.; DIMCHEFF, D. E.; WEHRLY, K.; CHESEBRO, B. Separate sequences in a murine retroviral envelope protein mediate neuropathogenesis by complementary mechanisms with differing requirements for tumor necrosis factor alpha. **Journal of Virology**, v. 78, p. 13104-13112, 2004.

PIGHETTI, G. M.; SORDILLO, L. M. Regulation of mammary gland macrophage tumor necrosis factor-alpha production with interferon-gamma. **Research in Veterinary Science**, v. 56, p. 252-255, 1994.

POLITIS, I.; MCBRIDE, B. W.; BURTON, J. H.; ZHAO, X.; TURNER, J. D. Secretion of interleukin-1 by bovine milk macrophages. **American Journal Veterinary Research**, v. 52, p. 858-862, 1991.

PYEON, D.; DIAZ, F.J.; SPLITTER, G. A. Prostaglandin E_2 increases bovine leukemia virus *tax* and *pol* mRNA levels via cyclooxygenase 2: Regulation by interleukin – 2, interleukin – 10, and. Bovine leukemia virus. **Journal of Virology**, v. 74, n. 12, p. 5740-5745, 2000.

PYEON, D.; O'REILLY, K. L.; SPLITTER, G. A. Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing or persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. **Journal of Virology**, v. 70, p. 5706-5710, 1996.

RAVAZZOLO, A. P.; COSTA, U. M. *Retroviridae*. In: FLORES, E. F. (Org.) **Virologia veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. p. 809-838.

RINALDI, M.; LI, R. W.; CAPUCO, A. V. Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 138, p. 267-279, 2010.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1077-1084, 2001.

RIOLLET, C.; RAINARD, P.; POUTREL, B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 161-167, 2000.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6° edição. São Paulo: Editora Manole, 2002. 500

ROMAGNANI, S. Immunologic influences on allergy and the Th1/Th2 balance. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, p. 395-400, 2004.

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

ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. Pharmacology of Interleukin-1 actions in the brain. **Advances in Pharmacology**,v. 25, p. 1-20, 1994.

ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G.; TOULMOND, S. Cytokines and their receptors in the central nervous system: Physiology, pharmacology, and pathology. **Pharmacology and Therapeutics,** v. 69, n. 2, p. 85-95, 1996. ISSN 01637258. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0029925745&partnerID=40&md5=1825bacdb79c6c107901cf1525b6a95f>. Acesso em 23 dez. 2011.

SCHALM, O. M.; NOORLANDER, D. D. Experiments and observations leading to development of the *California Mastitis test*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, p. 199-204, 1957.

SCHEERLINCK, J.-P. Y. Functional and structural comparison of cytokines in different species. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 72, n. 1-2, p. 39-44, 1999. ISSN 0165-2427. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TD5-3Y21V7S-7/2/a13d67df22454c4b21fdb0fc7ca23a37>. Acesso em 13 abr. 2011.

SCHWARTZ, I.; LEVY, D. Pathobiology of bovine leukemia virus. **Veterinary research**, v. 25, p. 521-536, 1994.

SEN, G. C.; LENGYEL, P.The interferon system – a bird's eye view of this biochesmitry. **Journal of Biology Chemistry**, v. 267, p. 5017-5020, 1992.

SHUSTER, D. E.; KEHRLI, M. E.; RAINARD, P.; PAAPE, M. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 3286-3292, 1997.

SILVA FILHO, A. P.; AFONSO, J. A. B.; SOUZA, J. C. A.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F.; DANTAS, A. C.; COSTA, N. A.; MENDONÇA, C. L. Linfossarcoma em bovinos no agreste meridional de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 591-597, 2011.

SMITH, G. L. Virus proteins that bind cytokines, chemokines or interferons. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, p. 467-471, 1996.

SORDILLO, L. M.; DALEY M. J. Role of cytokines in the prevention and treatment of mastitis. In: MEYERS, M. J.; MURTAUGH, M. P. (Ed.). **Cytokines in animal health and disease.** New York: M Dekker, 1995. p. 389-419.

SORDILLO, L. M.; HICKS, C. R.; PIGHETTI, G. M. Altered interleukin-2 production by lymphocyte populations from bovine leukemia virus-infected cattle. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 207, p. 268-273, 1994.

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

SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 135-146, 2002.

SOUZA, F. N. **Avaliação do estresse oxidativo sob a resposta imune de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina.** 2010. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

STÖBER, M. Enfermedades del sistema linfático y del bazo. In: DIRKSEN, G.; GRUNDER, H. D.; STOBER, M. **Medicina Interna y Cirugía del Bovino**. Buenos Aires: Inter-Médica, 2005. p. 123-145.

STONE, D. M.; HOF, A. J.; DAVIS, W. C. Up regulation of IL-12 receptor alpha and MHC class II expression on lymphocyte subpopulation from bovine leukemia virus infected lymphocytotic cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, p. 65-76, 1995.

TARTAGLIA, L. A.; AYRES, T. M.; WONG, G.H.; GOEDDEL, D. V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signalc cell death. **Cell**, v. 74, p. 845-853, 1993.

TAYAL, V.; KALRA, B. S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics – An update. **European Journal of Pharmacology**, v. 579, p. 1-12, 2008.

TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M.; JUNIOR, F. B. R. **Utilização das técnicas de ELISA e BIOLOG para estudos de diversidade intra-específica em isolados de *Azospirillum amazonense* associados a diferentes espécies da *Brachiaria***. Documento técnico 84, Cerrados**,** E. Planaltina: Embrapa, 2003. 34 p.

THOMPSON-SNIPES, L.; DHAR, V.; BOND, M.W.; MOS MANN, T. R.; MOORE, K. W.; RENNICK, D. M. Interleukin 10: a novel stimulatory factor mast cells and their progenitors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 173, p. 507-510, 1991.

TIZARD, R. I. **Introducción a la inmunología veterinaria.** 8. ed. Barcelona: Elsevier España, 2009. 574 p.

TOPHAM, M. K.; CARVETH, H. J.; MCINTYRE, T. M.; PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A. Human endothelial cells regulate polymorphonuclear leukocyte degranulation. **The FASEB Journal,** v. 12, p. 733-746, 1998.

TRUEBLOOD, E. S.; BROWN, W. C.; PALMER, G. H.; DAVIS, W. C.; STONE, D. M.; McELWAIN, T. F. B-lymphocyte proliferation during bovine leukemia virus-induced persistent lymphocytosis is enhanced by T-lymphocyte-derived interleukin-2. **Journal of Virology**, v. 72, p. 3169-3177, 1998.

USUI, T.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Expression of tumor necrosis fator-α in IgM+ B-cells from bovine leukemia virus-infected lymphocytotic sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 296-301, 2006.

USUI, T.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Interferon-γ expression associated with suppression of bovine leukemia virus at the early phase of infection in sheep. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, p. 17-23, 2007.

VARELLA, P. P. V.; FORTES, W. C. N. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, p. 146-154, 2001.

VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K.; O'KENNEDY, R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 486-493, 2009.

VILČEK, J.; FELDMANN, M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 25, p. 201-209, 2004.

WACK, A.; OPENSHAW, P.; O'GARRA, A. Contribution of cytokines to pathology and protection in virus infection. **Current Opinion in Virology**, v. 1, p. 184-195, 2011.

WALDVOGEL, A. S.; LEPAGE, M. F.; ZAKHER, A.; REICHEL, M. P.; EICHER, R.; HEUSSLER, V. T. Expression of interleukin-4, interleukin-4 splice variants and interferon-gamma mRMA in calves experimentally infected with *Fasciola hepatica*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, p. 53-63, 2004.

WATANABI, A.; YANG, Y.; SHIONO, H.; YOKOMIZO, Y. Effect of intramammary infusion of tumor necrosis factor-α on milk protein composition and induction of acute-phase protein in the lactating cow. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 47, p. 653-662, 2000.

WU, M. C.; SHANKS, R. D.; LEWIN, H. A. Milk and fat production in dairy cattle influenced by advanced subclinical bovine leukemia virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 993-996, 1989.

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

YAKOBSON, B.; BRENNER, J.; UNGAR-WARON, H.; TRAININ, Z. Short-termed expression of interleukin-12 during experimental BLV infection may direct disease progression to persistent lymphocytosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, p. 207-218, 1998.

YOKOYAMA, K.; OSAWA, T. The collaboration of T-cell subsets in the mitogenic stimulation of purified B-cell subpopulations. **Immunology**, v. 38, p. 789-796, 1979.

ZAITSEVA, M.; GOLDING, H.; MANISCHEWITZ, J.; WEBB, D.; GOLDING, B. *Brucella abortus* as a potencial vaccine candidate: induction of IL-12 secretion and enhanced B7-1 and B7-2 and ICAM-1 surface expression in elutriated human monocytes stimulated by heat-inactivated *B. abortus*. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 3109-3117, 1996.

ZAROS, L. G.; VIEIRA, L. S. **Citocinas na resposta a endoparasitoses gastrintestinais em ruminantes**. Documento técnico 80, Ceará, E. Sobral: Embrapa, 2008. 36 p.

ZECCONI, A.; PICCININI, R.; FIORINA, S.; CABRINI, L.; DAPRA, V.; AMADORI, M. Evaluation of interleukin-2 treatment for prevention of intramammary infections in cows after calving. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases,** v. 32, p. 439-451, 2009.