MILTON RICARDO AZEDO

**Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa de
leucócitos**

São Paulo

2007

MILTON RICARDO AZEDO

Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa de leucócitos

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

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

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

São Paulo

2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1838
FMVZ

Azedo, Milton Ricardo
Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa de leucócitos /
Milton Ricardo Azedo. – São Paulo: M. R. Azedo, 2007.
151 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

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

1. Bovinos. 2. Leucócitos. 3. Radicais livres. 5. Infecções por deltaretrovírus.
6. Leucose enzoótica bovina. I. Título.

ERRATA

AZEDO, M. R. **Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa de leucócitos.** [Influence of bovine enzootic respiratory burst activity of leukocytes]. 2007. 151 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

Folhas	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
9	1	3	(Mestre em Clínica Veterinária)	(Mestre em Medicina Veterinária)
11	1	3	(Mestre em Clínica Veterinária)	(Mestre em Medicina Veterinária)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência da leucose enzoótica dos bovinos na atividade oxidativa de leucócitos", protocolado sob o nº973/2006, 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 Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/10/06".

(We certify that the Research "Influence of bovine enzootic leukosis on respiratory burst activity of leukocytes", protocol number 973/2006, utilizing 100 (one hundred) bovines, under the responsibility of Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 10/18/2006).

São Paulo, 18 de outubro de 2006

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AZEDO, Milton Ricardo

Título: Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa de leucócitos

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

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha família.

*Aos meus pais, Laurinda (“Dona Lalá”) e Milton (“Seu Mimi”), minha gratidão...
a vocês, eu devo meu empenho.*

*Ao meu irmão, Carlos Eduardo Azedo (“Dudu”), minha admiração...
a você, eu devo minha inspiração.*

*A minha cunhada, Fabiana (“Fabi”), minha estima...
a você, eu devo minha afeição.*

*Aos meus sobrinhos, Rafael e Fernanda, minha dedicação...
a vocês, eu devo minha paixão.*

*A minha “nova irmã” Alice, minha lealdade...
a você, minha orientadora, eu devo meu presente.*

AGRADECIMENTOS

*Destino. Ele abençoou-me colocando em meu caminho a mais afável, a mais benevolente e, acima de tudo, a mais querida Orientadora que eu jamais poderia aspirar. Ou merecer. Por seus ensinamentos, pelo exemplo de profissional prestativa e paciente, de mãe, filha e esposa dedicada, pelo exemplo de mulher e amiga, **Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera**, mais do que sinceramente grato, a você este trabalho é dedicado... você mora no meu coração.*

*À carinhosa equipe formada pelas Médicas Veterinárias Pós-Graduandas **Maiara Garcia Blagitz, Camila Rocha Bastos e Bárbara Gabriela Soares Sanches**, pelo Médico Veterinário **Fernando Nogueira de Souza**, e pela aluna de graduação e bolsista de iniciação científica **Camila Freitas Batista**, nossa “caçulinha”. Pessoas tão heterogêneas e tão intensamente dedicadas. Sempre lhes serei grato... e fiel. Este trabalho é fruto da colaboração de cada um de vocês!!*

*A minha casa, **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, berço da minha formação, que me acolheu novamente e me ofereceu as melhores oportunidades.*

*Aos queridos Professores Doutores do Departamento de Clínica Médica, **Archivaldo Reche Júnior, Carlos Eduardo Larsson, Cássio Xavier de Mendonça Júnior, Eduardo Harry Birgel Júnior, Enrico Lippi Ortolani, Fernando José Benesi, Liliam Gregory, Márcia Mery Kogika, Maria Cláudia Araripe Sucupira, Maria Helena Akao Larsson, Mitika Kuribayashi Hagiwara, Raquel Yvonne Arantes Baccarin, Silvia Regina Ricci Lucas, Wanderley Pereira de Araújo e Wilson Roberto Fernandes**, por proporcionar adoráveis momentos de amizade e confiança. Por seus ensinamentos, disposição e carinho. Pela alegria da convivência e pelo incentivo, agradeço.*

*À **Profª. Drª. Cristina de Oliveira Massoco**, que não poupou esforços no direcionamento, na viabilização e na condução deste trabalho. Essencial... fundamental. Por sua presteza e auxílio, seus ensinamentos precisos e competência, por ter-me recebido de coração aberto, sou e serei sempre grato.*

*Especialmente, ao **Prof. Dr. Ubiraem Mario Schalch**, certamente o Médico Veterinário mais generoso que eu já conheci. Graças aos seus ensinamentos, tornei-me mais seguro. Graças a sua confiança, tornei-me profissional. Graças a sua benevolência, este trabalho pôde ser realizado. A você, sempre serei grato e renderei homenagem e respeito.*

*Aos educadores nos quais eu me espelho, **Prof. Dr. Maurício Garcia e Prof. Dr. Francisco Leydson Formiga Feitosa**, pelos ensinamentos profícuos e eternos. Dois Médicos Veterinários à frente do seu tempo. Pela honestidade, pela referência e inspiração... e pelo carinho da amizade, minha deferência.*

*Aos grandes amigos, funcionários desta Faculdade: **Maria Aparecida de Freitas, Adelaide F. J. Borges, Clara S. Mori, Carmem S. Ribeiro, Marly E. F. De Castro e Geraldo N. Thezi**, que, com um sorriso, um gesto, uma*

palavra, tornaram meus dias mais agradáveis. Pela convivência e pela colaboração, eu agradeço.

*Principalmente à **Cláudia Regina Stricagnolo**, técnica do Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, sempre querida e atenciosa. Sem sua ajuda, este trabalho não teria sido concluído.*

*Aos amigos da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes e do Hospital Veterinário de Pirassununga, da FMVZ-USP, **Edison, Francisco, Luis, Elias, Cecília, Zico, Paulão**, pela ajuda, sempre plena, e pela convivência, sempre simpática e doce.*

*Ao **Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior**, por disponibilizar a utilização do Laboratório de Técnicas Imunológicas Aplicadas à Morfofisiologia, do Departamento de Cirurgia, e ao **Prof. Dr. Luis Carlos de Sá-Rocha**, por permitir o uso do Laboratório de Neuroimunomodulação, do Departamento de Patologia Experimental e Comparada. Velhas amizades, novas possibilidades e a permanente colaboração incondicional. Obrigado!*

*De modo especial, às queridas Médicas Veterinárias doutorandas **Mônica Sakai, Janaína Munuera Monteiro e LÍlian de Jesus Oliveira**, apesar da distância, sempre perto. Pela boa vontade e disposição, pelo carinho, por sua enorme ajuda técnica, absolutamente imprescindível para a realização deste trabalho, muito obrigado!*

*À seleta amiga, Médica Veterinária **Rosemary Viola Bosch**, doutoranda do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, por ter-me acolhido e confortado, quando se fez necessário. Pelo incentivo, pela ajuda. Por seu enorme coração, sempre serei grato!!*

*Aos valiosos amigos, Médico Veterinário **Flávio Rafael Monteiro** e sua esposa, **Wellen Benedetti Monteiro**, pelo incentivo, carinho e torcida. E por compreender a ausência física. Vocês são muito especiais!*

*Aos companheiros do curso de Pós-Graduação... **todos, sem exceção!!** Por tornar meus dias mais ricos e aprazíveis. Por aturar um “tio”, às vezes “azedo” e ranzinza, mas, sempre, grato por poder estar junto de vocês. Pela troca de informações e experiências. Injusta troca, pois recebi bem mais do que dei. Obrigado... sem sua constante companhia teria sido bem mais difícil.*

*Especialmente aos seletos Médicos Veterinários **Fabio Celidonio Pogliani, Raimundo Alves Barreto Júnior e Rogério Batista dos Santos**, pela colaboração direta na confecção deste trabalho.*

*Aos colegas docentes na UNIMES, **Prof. Milton Kolber, Prof. Emílio Sciammarella e Profª. Drª. Valéria A. Caobianco Sant’Ana**, pelo apoio e companheirismo.*

*Às amigas do Departamento de Pós-Graduação da FMVZ-USP, **Cláudia Lima, Dayse Maria Alves Flexa e Joana Ferreira Dias de Vasconcelos**, e da Biblioteca Virginie Buff D’Ápice, especialmente às queridas **Elza Maria R. B.***

Faquim e Elena Aparecida Tanganini, pela amizade e colaboração na confecção desta dissertação.

Ao Sítio dos Cedros, que abriu suas portas, e a seus funcionários, em especial ao amigo “Tião”, que auxiliaram na coleta das amostras para a realização deste trabalho.

Aos animais tão involuntariamente envolvidos nesta pesquisa, motivo da certeza e do orgulho de uma profissão bem escolhida!

Acima de tudo, a minha família (meus pais, meu irmão, minha cunhada, sobrinhos, tios e primos). Mais que incentivadores, carinhosos. Mais que torcedores, cúmplices. Mais que queridos, essencialmente amados.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito, muito obrigado!

É preciso ousar para dizer cientificamente que
Estudamos,
Aprendemos,
Ensinamos...

... com sentimentos,
Com as emoções,
Com os medos,
Com a paixão e também com a razão
crítica.

Jamais com estas apenas.

Paulo Freire

RESUMO

AZEDO, M. R. **Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa de leucócitos.** [Influence of bovine enzootic leukosis on respiratory burst activity of leukocytes]. 2007. 151 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Diferentes populações de leucócitos desempenham papéis fundamentais na eliminação de agentes invasores através da sua fagocitose e destruição, utilizando-se de mecanismos dependentes (metabolismo oxidativo) e independentes de oxigênio. Baseando-se na hipótese de que o vírus da Leucose Enzoótica Bovina, uma enfermidade crônica, que afeta, particularmente, os órgãos ricos em tecido linfóide destes animais, altera quantitativa e qualitativamente as subpopulações de leucócitos circulantes dos bovinos, influenciando na qualidade da resposta imunológica inata destes animais, o presente estudo avaliou a produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por leucócitos circulantes, frente estímulo *in vitro* com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS) e após fagocitose de *Staphylococcus aureus* conjugados com iodeto de propídio (Sa-PI). Para tal, células foram obtidas de cinco vacas negativas no diagnóstico para LEB, de cinco vacas naturalmente infectadas pelo vírus da leucose bovina (VLB), alinfocitóticas, e de cinco vacas infectadas, manifestando linfocitose persistente (LP), e analisadas por citometria de fluxo. Foi averiguada a normalidade da distribuição dos resultados, utilizando-se do teste de Anderson-Darling, e sua homoscedasticidade, utilizando-se do teste F ou do teste de Lavene. Para a análise das frequências observadas, foi utilizado o teste Qui-quadrado. Para a avaliação das diferenças entre as médias dos resultados obtidos, foram feitos os testes de análise de variância (One-way ANOVA), de Tukey-Kramer, teste t de Student, de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis. A porcentagem média total de células produzindo H_2O_2 , caracterizada pela intensidade de fluorescência da 2,7-diclorofluoresceína, no ensaio sem estímulo *in vitro*, de 30,60%, foi menor ($p=0,005$) que aquela observada no ensaio com adição *in vitro* de LPS, de 52,00%, e que aquela obtida no ensaio com adição *in vitro* de PMA, de 63,13%. A porcentagem média total de células produzindo H_2O_2 no ensaio com estímulo por fagocitose *in vitro* de SaPI, de 47,47%, não diferiu da observada no ensaio sem estímulo. As porcentagens médias totais de células produzindo H_2O_2 não diferiram entre os ensaios em que houve prévio estímulo *in vitro*. Não houve diferença na porcentagem de leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 , entre os grupos experimentais, todavia, a produção intracelular média de H_2O_2 , sem estímulo *in vitro* ($p=0,007$), após adição *in vitro* de PMA ($p<0,001$), de

LPS ($p=0,001$) ou após fagocitose ($p=0,002$), de leucócitos obtidos de animais apresentando LP, foi menor que aquela verificada em células provenientes de animais soronegativos e de animais soropositivos alinfocitóticos. A porcentagem de leucócitos realizando fagocitose, caracterizada pela intensidade de fluorescência do iodeto de propídio, entre as células obtidas de animais com LP, de 7,20%, foi menor que aquela verificada nas amostras coletadas de animais soronegativos, de 12,90%, e soropositivos alinfocitóticos, de 14,70% ($p=0,047$). Além disso, as células provenientes de animais com LP apresentaram uma menor intensidade de fagocitose que aquela observada em leucócitos de animais soronegativos e soropositivos alinfocitóticos ($p<0,001$). Assim, os resultados obtidos demonstram uma vulnerabilidade funcional em leucócitos sanguíneos obtidos de animais infectados pelo VLB, manifestando LP.

Palavras-chave: Bovinos. Leucócitos. Radicais Livres. Infecções por Deltaretrovírus. Leucose Enzoótica Bovina.

ABSTRACT

AZEDO, M. R. **Influence of bovine enzootic leukosis on respiratory burst activity of leukocytes.** [Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa de leucócitos]. 2007. 151 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Different leukocyte populations play key roles on the elimination of foreign antigens through phagocytosis and killing by oxygen-independent and -dependent (respiratory burst) mechanisms. Assuming that Enzootic Bovine Leukosis virus (BLV), that causes a chronic disease, and affects, mainly, lymphoid tissues, alters bovine circulating leukocyte subpopulations quantitatively and qualitatively, and influences the innate immune response, this study evaluated the intracellular production of hydrogen peroxide (H_2O_2) of circulating leukocytes after *in vitro* stimuli with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), *Escherichia coli* lipopolysaccharides (LPS), or phagocytosis of propidium iodide-labeled *Staphylococcus aureus* (PI-Sa). Cells were obtained from five BLV-negative cows, five naturally BLV-infected, non-lymphocytotic cows, and five BLV-positive cows with persistent lymphocytosis (PL), and analyzed by flow cytometry. Normality was tested using the Anderson-Darling test, followed by an F test or a Lavene's test to analyze the equality of variances. Differences among frequencies were tested using the Qui-square test. Differences among means were verified by a one way analysis of variance (ANOVA), followed by a Turkey-Kramer test, or a Student *t*-test, a Mann-Whitney U-test, or a Kruskal-Wallis test. Mean total percentage of H_2O_2 -producing cells, characterized by the intensity of 2,7-dichlorofluorescein fluorescence, in the assay without *in vitro* stimulus (30.60%) was smaller ($p=0.005$) than that verified in the assay after *in vitro* addition of LPS (52.00%), and after addition of PMA (63.13%). Mean total percentage of H_2O_2 -producing cells in the assay with stimulus by *in vitro* phagocytosis of PI-Sa (47.47%) was not different from that verified in the assay without *in vitro* stimulus. Mean total percentages of H_2O_2 -producing leukocytes did not differ among assays with previous *in vitro* stimuli. There was no difference in the percentages of H_2O_2 -producing leukocytes, among cells obtained from cows that belonged to different groups. However, mean intracellular H_2O_2 -production of leukocytes obtained from BLV-infected cows, presenting PL, without *in vitro* stimulus ($p=0.007$), after *in vitro* addition of PMA ($p<0.001$), or LPS ($p=0.001$), or after phagocytosis ($p=0.002$) was smaller than that verified in leukocytes obtained from non-infected and from BLV-infected, non-lymphocytotic, cows. The percentage of leukocytes that were carrying out phagocytosis, characterized by the intensity of

propidium iodide fluorescence, among cells obtained from BLV-infected cows, presenting PL (7.20%), was smaller ($p=0.047$) than that verified among cells obtained from non-infected and from BLV-infected (12.90%), non-lymphocytotic (14.70%), cows. Furthermore, leukocytes obtained from BLV-infected cows, presenting PL, showed smaller phagocytosis intensity ($p<0.001$) than leukocytes obtained from non-infected and from BLV-infected, non-lymphocytotic, cows. Therefore, results show a functional vulnerability of circulating leukocytes obtained from BLV-infected, lymphocytotic cows.

Key words: Bovine. Leukocytes. Free radicals. Deltaretrovirus Infections. Enzootic Bovine Leukosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Quantidades dos componentes utilizados por tubo, na avaliação da produção intracelular de peróxido de hidrogênio por citometria de fluxo – São Paulo – 2007.....	52
Figura 2 –	Resultado da imunodifusão em gel de agar (IDAG) para diagnóstico de leucose enzoótica bovina em 99 vacas da raça Holandês Preto e Branco – São Paulo – 2007.....	55
Figura 3 –	Distribuição de 99 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função dos resultados da imunodifusão em gel de agar (IDAG) para diagnóstico de leucose enzoótica bovina e do leucograma – São Paulo – 2007.....	56
Figura 4 –	Histograma da distribuição de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco em função da idade (meses), em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	57
Figura 5 –	Histograma da contagem de eritrócitos (células $\times 10^6$ /mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	60
Figura 6 –	Histograma da contagem total de leucócitos (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	60
Figura 7 –	Histograma da contagem absoluta de linfócitos totais (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	61
Figura 8 –	Histograma da contagem absoluta de linfócitos pequenos (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	62
Figura 9 –	Histograma da contagem absoluta de linfócitos grandes (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	63
Figura 10 –	Histograma da contagem absoluta de linfócitos atípicos (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	64
Figura 11 –	Histograma da contagem absoluta de neutrófilos totais (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	65
Figura 12 –	Histograma da contagem absoluta de neutrófilos segmentados (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	66
Figura 13 –	Porcentagem de leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes estímulos <i>in vitro</i> , realizada em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	68

Figura 14 – Porcentagem de leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes ensaios, realizada em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	70
Figura 15 – Tamanho médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes estímulos <i>in vitro</i> , em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	71
Figura 16 – Tamanho médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes ensaios, realizada em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	72
Figura 17 – Tamanho médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) que não estavam produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes estímulos <i>in vitro</i> , em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	74
Figura 18 – Tamanho médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) que não estavam produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes ensaios, realizados em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	75
Figura 19 – Valores de SSC médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes estímulos <i>in vitro</i> , em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	80
Figura 20 – Valores de SSC médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes ensaios, realizada em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	81
Figura 21 – Valores de SSC médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) que não produziam peróxido de hidrogênio, frente diferentes estímulos <i>in vitro</i> , em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	83
Figura 22 – Valores de SSC médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) que não produziam peróxido de hidrogênio, frente diferentes ensaios, realizada em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	84
Figura 23 – Produção intracelular de peróxido de hidrogênio (em valores arbitrários de fluorescência), frente diferentes estímulos <i>in vitro</i> , verificada em leucócitos de amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	89

Figura 24 – Produção intracelular de peróxido de hidrogênio (em valores arbitrários de fluorescência), frente diferentes ensaios, verificada em leucócitos de amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	90
Figura 25 – Porcentagem de leucócitos fagocitando <i>Staphylococcus aureus</i> , avaliada por citometria de fluxo em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	93
Figura 26 – Tamanho médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) em relação à fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i> , em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo 2007.....	94
Figura 27 – Tamanho médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) em função do grupo experimental, em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação à fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i> – São Paulo – 2007.....	95
Figura 28 – Valores de SSC médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) em relação à fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i> , em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo 2007.....	96
Figura 29 – Valores de SCC médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) em função do grupo experimental, em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação à fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i> – São Paulo – 2007.....	97
Figura 30 – Intensidade de fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i> (em valores arbitrários de fluorescência do iodeto de propídio), verificada em leucócitos de amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007.....	98
Figura 31 – Porcentagens médias de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, verificadas por citometria de fluxo, em relação à produção intracelular de peróxido de hidrogênio frente à fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> , separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	100
Figura 32 – Porcentagens médias de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao subgrupo, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	101
Figura 33 – Valores (arbitrários) de FSC médio de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação à produção intracelular de peróxido de hidrogênio frente à fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> , separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	103

Figura 34 – Valores (arbitrários) de FSC médio de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao subgrupo, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	104
Figura 35 – Valores (arbitrários) de SSC médio de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação à produção intracelular de peróxido de hidrogênio frente à fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> , separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	106
Figura 36 – Valores (arbitrários) de SSC médio de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao subgrupo, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	107
Figura 37 – Intensidade média de fluorescência (em valores arbitrários) de leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio intracelular frente à fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> , separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	108
Figura 38 – Intensidade média de fluorescência (em valores arbitrários) de leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio intracelular em função da fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> , separados por grupo experimental – São Paulo – 2007.....	109
Figura 39 – Intensidade média de fluorescência do iodeto de propídio (em valores arbitrários), em leucócitos realizando fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i> , em função da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) intracelular, separados por grupo experimental – São Paulo – 2007.....	111
Figura 40 – Intensidade média de fluorescência (em valores arbitrários) do iodeto de propídio, em leucócitos realizando fagocitose de <i>Staphylococcus aureus</i> , em relação à produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) intracelular, conforme o grupo experimental – São Paulo – 2007.....	112
Figura 41 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soronegativa para Leucose Enzoótica Bovina, em ensaio sem prévio estímulo <i>in vitro</i> – São Paulo – 2007.....	142
Figura 42 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soronegativa para Leucose Enzoótica Bovina, em ensaio após adição, <i>in vitro</i> , de PMA – São Paulo – 2007.....	142
Figura 43 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soronegativa para Leucose Enzoótica Bovina, em ensaio após adição, <i>in vitro</i> , de LPS – São Paulo – 2007.....	143
Figura 44 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soronegativa para Leucose Enzoótica Bovina, em ensaio após fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> conjugado ao iodeto de propídio – São Paulo – 2007.....	143
Figura 45 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, alinfocitótica, em ensaio sem prévio estímulo <i>in vitro</i> – São Paulo – 2007.....	144

Figura 46 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, alinfocitótica, em ensaio após adição, <i>in vitro</i> , de PMA – São Paulo – 2007.....	144
Figura 47 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, alinfocitótica, em ensaio após adição, <i>in vitro</i> , de LPS – São Paulo – 2007.....	145
Figura 48 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, alinfocitótica, em ensaio após fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> conjugado ao iodeto de propídio – São Paulo – 2007..	145
Figura 49 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente, em ensaio sem prévio estímulo <i>in vitro</i> – São Paulo – 2007.....	146
Figura 50 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente, em ensaio após adição, <i>in vitro</i> , de PMA – São Paulo – 2007.....	146
Figura 51 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente, em ensaio após adição, <i>in vitro</i> , de LPS – São Paulo – 2007.....	147
Figura 52 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente, em ensaio após fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> conjugado ao iodeto de propídio – São Paulo – 2007.....	147
Figura 53 – Dotplot da produção de H ₂ O ₂ (FL1), em função da fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> (FL2), por leucócitos sangüíneos, em amostra de vaca soronegativa para Leucose Enzoótica Bovina – São Paulo – 2007.....	148
Figura 54 – Dotplot da produção de H ₂ O ₂ (FL1), em função da fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> (FL2), por leucócitos sangüíneos, em amostra de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, alinfocitótica – São Paulo – 2007.....	148
Figura 55 – Dotplot da produção de H ₂ O ₂ (FL1), em função da fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> (FL2), por leucócitos sangüíneos, em amostra de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente – São Paulo – 2007.....	149
Figura 56 – Histograma da quantidade de leucócitos sangüíneos realizando fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> (FL2), em amostra de vaca soronegativa para Leucose Enzoótica Bovina – São Paulo – 2007.....	149
Figura 57 – Histograma da quantidade de leucócitos sangüíneos realizando fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> (FL2), em amostra de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, alinfocitótica – São Paulo – 2007.....	150
Figura 58 – Histograma da quantidade de leucócitos sangüíneos realizando fagocitose <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> (FL2), em amostra de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente – São Paulo – 2007....	150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores do leucograma de fêmeas bovinas sadias, estratificadas segundo a idade, criadas no Estado de São Paulo, utilizados como referência no presente trabalho – São Paulo – 2007.....	50
Tabela 2 – Resultados médios do hemograma, em números absolutos (média $\pm$ desvio padrão – DP), de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	58
Tabela 3 – Resultados médios da contagem diferencial relativa de leucócitos sangüíneos (%), de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	59
Tabela 4 – Porcentagens (média $\pm$ desvio padrão) de leucócitos obtidos de amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, produzindo peróxido de hidrogênio intracelular frente diferentes estímulos <i>in vitro</i> , verificadas por citometria de fluxo, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	68
Tabela 5 – Valores de FSC (média $\pm$ desvio padrão) de leucócitos que estavam produzindo peróxido de hidrogênio intracelular frente diferentes estímulos <i>in vitro</i> , obtidos de amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	71
Tabela 6 – Valores de FSC (média $\pm$ desvio padrão) de leucócitos que não estavam produzindo peróxido de hidrogênio intracelular frente diferentes estímulos <i>in vitro</i> , obtidos de amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	73
Tabela 7 – Comparação entre o FSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários), em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) sem estímulo <i>in vitro</i> , de leucócitos obtidos de amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	76
Tabela 8 – Comparação entre o FSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários), em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) após estímulo <i>ex vivo</i> com a adição de PMA, de leucócitos obtidos de amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	76
Tabela 9 – Comparação entre o FSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários), em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) após estímulo <i>ex vivo</i> com a adição de LPS, de leucócitos obtidos de amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	77

Tabela 10 – Comparação entre o FSC (média ± desvio padrão de valores arbitrários), em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) após estímulo com fagocitose <i>ex vivo</i> de SaPI, de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	78
Tabela 11 – Valores de SSC (média ± desvio padrão de valores arbitrários) de leucócitos que estavam produzindo peróxido de hidrogênio intracelular frente diferentes estímulos <i>in vitro</i> , obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	79
Tabela 12 – Valores de SSC (média ± desvio padrão de valores arbitrários) de leucócitos que não produziam peróxido de hidrogênio intracelular frente diferentes estímulos <i>in vitro</i> , obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	82
Tabela 13 – Comparação entre o SSC (média ± desvio padrão de valores arbitrários), em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) sem estímulo <i>ex vivo</i> , de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	85
Tabela 14 – Comparação entre o SSC (média ± desvio padrão de valores arbitrários), em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) após estímulo <i>ex vivo</i> com a adição de PMA, de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	86
Tabela 15 – Comparação entre o SSC (média ± desvio padrão de valores arbitrários), em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) após estímulo <i>ex vivo</i> com a adição de LPS, de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	87
Tabela 16 – Comparação entre o SSC (média ± desvio padrão de valores arbitrários), em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) após estímulo com fagocitose <i>ex vivo</i> de SaPI, de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	87
Tabela 17 – Intensidade de fluorescência (média ± desvio padrão de valores arbitrários) de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, produzindo peróxido de hidrogênio intracelular frente diferentes estímulos <i>ex vivo</i> , verificadas por citometria de fluxo (FL1), separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	88
Tabela 18 – Avaliação da fagocitose <i>ex vivo</i> de SaPI, por citometria de fluxo, de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	92

Tabela 19 – Porcentagens médias de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, verificadas por citometria de fluxo, em relação à produção intracelular de peróxido de hidrogênio frente à fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	99
Tabela 20 – Valores (arbitrários) de FSC médio de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação à produção intracelular de peróxido de hidrogênio frente à fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	102
Tabela 21 – Valores (arbitrários) de SSC médio de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação à produção intracelular de peróxido de hidrogênio frente à fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	105
Tabela 22 – Intensidade média de produção intracelular de peróxido de hidrogênio (em valores arbitrários de fluorescência) de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, frente à fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	108
Tabela 23 – Intensidade média de fluorescência do iodeto de propídio (em valores arbitrários) de leucócitos, após fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI, frente à produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) intracelular, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	célula apresentadora de antígeno
CAT	catalase
CMSP	células mononucleares de sangue periférico
DAF-2-DA	diacetato de 4,5-Diaminofluoresceína
DCF	2,7-diclorofluoresceína
DCFH-DA	diacetato de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína
DHR123	dihidrorodamina 123
DHR6G	dihidrorodamina 6G
DNA	ácido desoxirribonucleico
ELISA	ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática
ERN	espécie reativa do nitrogênio
ERO	espécie reativa de oxigênio
FIV	vírus da imunodeficiência felina
gp51	glicoproteína 51
GSH-PX	glutathione peroxidase
GSSG-GR	glutathione reductase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HIV	vírus da imunodeficiência de humanos
HMPS	<i>shunt</i> de hexose monofosfato
HTLV	vírus linfotrópicos de células T de humanos
IDAG	imunodifusão em agar gel
Ig	Imunoglobulina
IL	interleucina
INF	interferon
LEB	leucose enzoótica bovina
LEsB	leucose esporádica bovina
LP	linfocitose persistente
LPS	lipopolissacarídeos
MHC	complexo de histocompatibilidade principal

MPO	mieloperoxidase
N:C	relação núcleo:citoplasma
NADPH	fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NBT	<i>nitro blue tetrazolium</i>
NK	células matadoras naturais
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
O ₂	oxigênio
O ₂ ⁻	ânion superóxido
⁻ OH	hidroxila
ONOO ⁻	peróxido nítrico
p24	proteína 24
PCR	reação em cadeia da polimerase
PKC	proteína quinase C
PMA	12-miristato 13-acetato de forbol
PTK	tirosina quinase
PTLV	vírus linfotrópicos de células T de primatas
RNA	ácido ribonucleico
SaPI	<i>Staphylococcus aureus</i> conjugados com iodeto de propídio
SOD	superóxido dismutase
STLV	vírus linfotrópicos de células T de símios
TNF	fator de necrose tumoral
VLB	vírus da leucose bovina
ΔGO ₂	oxigênio singleto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	28
2.1	A LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA.....	28
2.2	LEUCÓCITOS E DEFESA IMUNOLÓGICA.....	37
2.2.1	Produção de radicais oxidativos	41
2.3	MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OXIDATIVA.....	44
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	ANIMAIS EMPREGADOS.....	48
4.2	COLETAS DE SANGUE.....	48
4.3	ANÁLISE HEMATOLÓGICA.....	49
4.4	SORODIAGNÓSTICO.....	50
4.5	FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	50
4.6	PRODUÇÃO INTRACELULAR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.....	51
4.6.1	Preparo das amostras	51
4.6.2	Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio por citometria de fluxo..	52
4.6.3	Reagentes utilizados	53
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
5	RESULTADOS	55
5.1	TRIAGEM E CONFIRMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	55
5.1.1	Avaliação do hemograma dos animais selecionados	57
5.2	ENSAIOS DE PRODUÇÃO INTRACELULAR DE H ₂ O ₂ E DE FAGOCITOSE.....	66
5.2.1	Ensaio de produção intracelular de H₂O₂	67
5.2.1.1	Porcentagem de leucócitos produzindo H ₂ O ₂ frente a diferentes estímulos <i>ex vivo</i>	67
5.2.1.2	Tamanho das células produzindo H ₂ O ₂	70
5.2.1.3	Tamanho das células que não estavam produzindo H ₂ O ₂	73
5.2.1.4	Comparação do tamanho das células frente à produção de H ₂ O ₂	75
5.2.1.5	Complexidade das células produzindo H ₂ O ₂	78

5.2.1.6	Complexidade das células que não estavam produzindo H ₂ O ₂	82
5.2.1.7	Comparação da complexidade celular frente à produção de H ₂ O ₂	85
5.2.1.8	Intensidade de fluorescência.....	88
5.2.2	Avaliação da fagocitose por citometria de fluxo	91
5.2.2.1	Porcentagem de leucócitos realizando fagocitose.....	92
5.2.2.2	Tamanho das células.....	93
5.2.2.3	Complexidade das células.....	95
5.2.2.4	Intensidade de fluorescência.....	97
5.2.3	Avaliação da produção de H₂O₂ em função da fagocitose	98
5.2.3.1	Porcentagem de leucócitos em cada subgrupo.....	99
5.2.3.2	Tamanho das células.....	101
5.2.3.3	Complexidade das células.....	104
5.2.3.4	Intensidade da produção de H ₂ O ₂ em função da fagocitose.....	107
5.2.3.5	Intensidade da fagocitose em função da produção de H ₂ O ₂	109
6	DISCUSSÃO	113
7	CONCLUSÃO	127
	REFERÊNCIAS	128
	APÊNDICE	142

1 INTRODUÇÃO

Maximizar a eficiência é o principal objetivo de programas voltados para a produção animal. Contudo, a pecuária bovina brasileira é caracterizada por marcantes contrastes. Apesar de possuir o segundo maior rebanho bovino do mundo e a despeito do fato do país destacar-se na exportação mundial de carne, diversos fatores fazem com que a bovinocultura nacional não consiga aprimorar a produção e/ou diminuir seus custos a ponto de abastecer o mercado com produtos acessíveis e de qualidade adequada.

Além das desigualdades geográficas, culturais e econômicas das diferentes regiões, outros aspectos contribuem, até em maior grau, para as diferenças na produtividade da indústria pecuária nacional. Erros no manejo nutricional, marcados, principalmente, pela incorreta utilização das pastagens e precária suplementação alimentar (quando utilizada), incorrem em uma sazonalidade da produção e em um maior tempo para se atingir um peso ideal de abate. Incorreções no manejo reprodutivo e na seleção a favor de animais melhorados geneticamente acabam por fornecer e perpetuar no rebanho animais com características subprodutivas.

Contudo, são as deficiências no manejo sanitário que acabam por acarretar os maiores prejuízos, refletidos na diminuição da performance produtiva, aumento dos custos de produção e, principalmente, perpetuação de enfermidades no rebanho nacional pela presença não diagnosticada de portadores disseminando agentes infecciosos a animais sadios.

Não obstante, considerando-se as condições edafoclimáticas e reputando-se investimentos no desenvolvimento de melhores técnicas de produção, buscando agregar características ideais ao rebanho nacional, com rígidos programas de manejo alimentar e reprodutivo e conscientes controles sanitários que aquilatem a saúde animal e humana, a produção bovina brasileira pode tornar-se muito mais eficiente.

Principalmente em criações nas quais o manejo sanitário não é feito adotando-se preceitos bem estabelecidos pela comunidade veterinária, mas também naquelas em que os cuidados com a saúde dos animais são considerados básicos e primordiais, os bovinos são constantemente desafiados por agentes patogênicos que podem deflagrar enfermidades passíveis de promover indesejáveis alterações em seus índices de produção.

Destarte, a proteção provida pelos mecanismos imunológicos inatos, primeira barreira especificamente desenvolvida contra a penetração de patógenos em um organismo, desempenha papel crucial na defesa contra doenças infecciosas.

As células envolvidas no sistema imunológico inato são compostas por aquelas da linhagem monócito/macrófago, pelos granulócitos e pelas células matadoras naturais (NK) (ABBAS et al., 1997). Uma característica comum a estas populações celulares é sua habilidade em reconhecer e destruir antígenos estranhos ou células infectadas, sem a necessidade de ter havido um prévio encontro com tais antígenos. Para tanto, tais células utilizam-se da fagocitose e de atividades dependentes de oxigênio, relacionadas à explosão respiratória (do inglês: *respiratory burst*), e não-dependentes de oxigênio, funções fundamentais na destruição e eliminação do agente invasor (ALBERTS et al., 2002). Além disso, os fagócitos interagem com as demais células que compõem o sistema imunológico, mormente os linfócitos, agindo como células apresentadoras de antígenos e, deste modo, participando como deflagrações e efetoras na resposta imunológica gerada (ABBAS et al., 1997).

Nota-se, de tal modo, que alterações nas funções inerentes a tais populações celulares, induzidas ou não pela interação de fatores exógenos, tais como drogas, injúrias físicas ou infecções intracelulares, característica das infecções virais, nas diversas populações de leucócitos relacionadas à resposta imunológica, podem levar o animal a um estado depletivo na proteção fornecida pelo aparato imunológico, caracterizando um quadro de imunossupressão.

A leucose enzoótica bovina (LEB), uma enfermidade crônica, que afeta, particularmente, os órgãos ricos em tecido linfóide destes animais, é causada pelo vírus da leucose bovina (VLB), um deltaretrovírus relacionado aos vírus linfotrópicos de células T de primatas (SAGATA; IKAWA, 1984; SAGATA et al., 1985).

É sabido que esta infecção contribui para uma menor produção na pecuária bovina quer por seus efeitos danosos diretos, relacionados ao desenvolvimento de linfomas, quer por consequências indiretas (THURMOND, 1987). No entanto, o efeito da infecção na função das diferentes populações celulares envolvidas na resposta imunológica, assim como seu papel no estabelecimento de outras doenças oportunistas e de um estado imunossupressivo, ainda não está claro.

Por um lado, os efeitos da infecção pelo VLB na função das diferentes células constituintes do sistema imunológico do hospedeiro podem ser a causa do longo período latente e das diversas manifestações encontradas nesta infecção (SCHWARTZ; LEVY, 1994). Outrossim, tal interferência também pode alterar a resposta imunológica do hospedeiro a outros agentes, caracterizando imunossupressão (KABEYA et al., 2001).

Estudos acerca dos mecanismos patogênicos do VLB fornecem informações para a

elucidação das interações entre os demais Deltaretrovírus e seus hospedeiros (WILLEMS, 2004). Ainda, um melhor conhecimento de alterações nas funções das células envolvidas na defesa do hospedeiro, conferidas por agentes infecciosos, pode contribuir sobremaneira na elucidação dos mecanismos utilizados por outros patógenos que acometem os animais de produção.

No entanto, desde há muito, as pesquisas abrangendo a LEB são pautadas, primordialmente, nos aspectos econômicos da enfermidade, nos meios diagnósticos, nos levantamentos epidemiológicos (sorológicos e, ultimamente, genéticos), nos modos de transmissão e em programas de controle. Alguns estudos encerram, por sua vez, aspectos relacionados às manifestações tumorais, conquanto é suposto um caráter “benigno” e “assintomático” às outras formas de apresentação da doença.

Muitas enfermidades são valorizadas e consideradas importantes com base na exuberância de suas manifestações, não raro agudas, e, principalmente, quando há possibilidade de morte do animal ou evidentes perdas econômicas. Essas observações são compreensíveis em um leigo, mas a hipótese de uma doença limitar mecanismos de defesa de forma crônica não pode ser minimizada pela classe médica veterinária contemporânea.

Por se tratar de um vírus com tropismo principal por linfócitos B, investigações a propósito de uma possível imunossupressão vêm sendo feitas com ênfase em testes funcionais envolvendo, basicamente, linfócitos. Não obstante, diferentes populações de leucócitos apresentam papéis fundamentais na eliminação de agentes invasores através da sua fagocitose e destruição. O estudo destas funções tem importantes implicações na pesquisa de disfunções leucocitárias, no estudo da interação entre os microrganismos e o hospedeiro, na avaliação de tratamentos e de diversas condições indutoras de enfermidades em várias espécies de animais. Todavia, técnicas rápidas e precisas capazes de avaliar tais funções são requeridas e, neste campo, a citometria de fluxo oferece notável contribuição.

Muito embora diversos métodos para estimar a fagocitose e o metabolismo oxidativo de células humanas, utilizando-se de citometria de fluxo, tenham sido desenvolvidos (SILVEIRA, 2004; SOH, 2006), existem poucos relatos empregando-os para avaliar leucócitos bovinos (KAMPEN et al., 2004a,b; SMITS et al., 1997) e, até onde se pôde compilar, não há relatos deste tipo de avaliação em animais infectados pelo VLB.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Iniciamos com os conhecimentos acerca da infecção pelo VLB, um retrovírus de reconhecido potencial oncogênico, e com reminiscências sobre os mecanismos de defesa utilizados por células envolvidas na resposta imunológica inata, tendo em vista uma maior compreensão de um possível envolvimento da LEB na alteração desta resposta.

Passamos, em seguida, a peculiaridades relativas às alternativas laboratoriais passíveis de detectar tais alterações.

2.1 A LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

Em meados do século XIX, um inquérito que levantara as condições sanitárias das cidades inglesas evidenciou a íntima relação entre a incidência de doenças infecciosas nas famílias e a falta de higiene (UJVARI, 2003). Naqueles tempos, tal inquérito ratificou a “teoria dos miasmas”, em que locais contendo dejetos e lixo orgânico “emanavam substâncias invisíveis” e nocivas que causavam as epidemias, postulada em tempos mais remotos, séculos antes. Tempos em que se supunha que a malária provinha do mau cheiro de locais pantanosos. Daí: “maus ares” e “malária” (GORDON, 2002).

Seriam necessárias incontáveis e seguidas descobertas científicas, ao longo do final do século XIX e do início do século XX, para que os profissionais da área de saúde compreendessem as verdadeiras causas das infecções e as complexidades das relações destes agentes e seus hospedeiros.

As últimas décadas do século XIX foram marcadas pela derrota francesa na Guerra Franco-Prussiana, em 1871, e pela decorrente unificação do Estado alemão. Entretanto, além disso, o fim da guerra propiciaria meios para a elucidação do papel de agentes infecciosos como causadores de doenças. Na França, Luis Pasteur pôde reiniciar seus estudos interrompidos pela guerra, e, na Prússia (a partir de então, Alemanha), um médico que servira na guerra pôde estabelecer-se no distrito de Wollstein. Seu nome, Robert Koch (FRIEDMAN; FRIEDLAND, 2000).

Ambas escolas estudavam uma enfermidade que preocupava em demasia os órgãos governamentais responsáveis pela pecuária nestas nações, por matar inúmeros bovinos,

caprinos e eqüinos, o antraz (GORDON, 2002). Apesar das cizânias pessoais e das marcantes divergências políticas (FRIEDMAN; FRIEDLAND, 2000), os trabalhos de Koch e Pasteur, por quase dez anos, foram somatórios no esclarecimento da etiologia, do mecanismo de transmissão e das medidas profiláticas acerca do antraz bovino e, por conseguinte, na elucidação dos meios envolvidos nos diversos processos infecciosos (UJVARI, 2003).

Segundo Olson e Miller (1985), as primeiras descrições de bovinos apresentando manifestações de enfermidades condizentes com aquelas que viriam a ser reconhecidas como as da leucose bovina, ocorreram em jornais médicos ou veterinários na Alemanha na segunda metade do século XIX. Tais autores consideraram uma descrição de Leistering, em 1981, de uma vaca apresentando esplenomegalia com discretos nódulos arredondados, de coloração branco-amarelada, compostos por células linfóides e maiores que os folículos esplênicos normais, o primeiro caso relatado da enfermidade.

Entretanto, àquela época, de Pasteur e Koch, animais com esplenomegalia eram cuidadosamente examinados para excluir a possibilidade de antraz. Observa-se que os autores também relataram a ocorrência, na década anterior, de diversas descrições de casos de leucemia em bovinos, que apresentavam esplenomegalia com folículos proeminentes, achados semelhantes àqueles posteriormente relatados por Leistering.

Passaram-se décadas até que novas observações possibilitassem o isolamento do vírus causador da enfermidade (MILLER et al., 1969). Tal descoberta confirmou a anterior classificação epidemiológica e anátomo-patológica da doença, feita por de Bendixen (1965). Deste modo, a leucose bovina foi classificada em LEB, relacionada à presença do vírus, enquanto as raras formas juvenil (ou de bezerros), tímica e cutânea foram agrupadas como Leucose Esporádica Bovina (LEsB), não estando associadas à infecção pelo VLB.

A LEsB, na forma juvenil, pode ser observada, mais freqüentemente, do nascimento até os dois anos de idade, com presença de formações tumorais em vários linfonodos e órgãos internos. Já a forma tímica, com tumores da laringe até a cavidade torácica, e a forma cutânea, ocorrem, geralmente, em bovinos de 2 a 3 anos de idade (PARODI, 1987).

Assim, a LEB foi caracterizada como uma enfermidade neoplásica infecto-contagiosa, pluri-sintomática, de evolução caracteristicamente crônica, que afeta, particularmente, a linhagem celular linfóide destes animais (SCHWARTZ; LEVY, 1994).

Seu agente etiológico, o VLB encontra-se, atualmente, assim como os vírus linfotrópicos de células T de primatas (PTLV: de humanos – HTLV tipos 1 e 2 – e de símios – STLV tipos 1, 2, 3, PP e L), no gênero *Deltaretrovirus* da família *Retroviridae* (FAUQUET et al., 2004). Sensíveis à ação de solventes, detergentes, ao congelamento e ao calor, e

relativamente resistentes à luz ultravioleta (DONOVAN, 2003; SHIMIZU et al., 2004; QUINN et al., 2005), os retrovírus são vírus esféricos contidos em envelope glicoprotéico, com 80 a 100 nm de diâmetro. Seus capsídeos icosaédricos envolvem um nucleocapsídeo helicoidal, que contém duas fitas de ácido ribonucleico (RNA) lineares, simples e de sentido positivo, além de proteínas centrais, incluindo as enzimas transcriptase reversa e integrase (QUINN et al., 2005).

Compartilhando arranjo estrutural e genético com os deltaretrovírus humanos (SAGATA; IKAWA, 1984; SAGATA et al., 1985), que são associados à leucemia de células T e linfoma em adultos (SEIKI et al., 1982), ambos desenvolvem doença crônica e proliferação das células-alvo envolvendo células e mediadores imunológicos (SCHWARTZ; LEVY, 1994; JOHNSON et al., 2001).

Por esta razão, o VLB tem sido, há décadas, sugerido como um profícuo modelo animal para o estudo da influência dos vírus oncogênicos linfotrópicos na resposta imunológica do hospedeiro (MILLER, 1974; JOHNSON; KANEENE, 1991a; CREMER; GRUBER, 1992; UNGAR-WARON et al., 1999).

Além disso, apesar de, recentemente, não ter sido encontrado o ácido desoxirribonucleico (DNA) proviral do VLB em pacientes com leucemia humana e com câncer de pulmão que consumiam carne bovina oriunda de regiões endêmicas para a LEB (LEE et al., 2005), Buehring et al. (2003) haviam encontrado anticorpos reativos com o VLB em 74% de 257 amostras de soro humano. Tal fato sugere exposição humana ao vírus através da alimentação, sem, necessariamente, apresentar a infecção, ressalva-se.

Ainda, tais estudos compartilham da preocupação antiga de um possível potencial zoonótico do VLB ou, pelo menos, pelo considerável número de reações sorológicas falso-positivas em humanos, em testes sorod diagnósticos para a detecção de portadores de infecções pelo HTLV ou pelo vírus da imunodeficiência de humanos (HIV) (KVARNFORS et al., 1975; OLSON; DRISCOLL, 1978a,b; BURRIDGE, 1981; DONHAM et al., 1987; MARUYAMA et al., 1989; JOHNSON; KANEENE, 1991a; JACOBS et al., 1992; DIGIACOMO; HOPKINS, 1997). Foi, inclusive, sugerido que mutações no VLB teriam contribuído para o surgimento do HTLV (GALLO et al., 1983) ou que recombinações envolvendo o VLB poderiam ter dado origem ao HIV (SIEFKES, 1993).

A LEB acomete bovinos em praticamente todos os países, sendo mais diagnosticada em rebanhos produtores de leite. No Brasil, sua ocorrência foi relatada em quase todos os Estados (GARCIA, 1989; SIMÕES, 1998; TÁVORA, 1991; BIRGEL JÚNIOR, 1991; D'ANGELINO, 1991; MELO, 1991; 1999; ABREU, 1993; CARVALHO, 1995;

CARNEIRO, 2000; SILVA, 2001), com variadas taxas de incidência (D'ANGELINO et al., 1998a). Entretanto, na média, acompanham a incidência observada em rebanhos de outros países, de 24% a 42%, para rebanhos leiteiros (OLSON et al., 1973), e de 1% a 3%, para rebanhos voltados para a produção de carne (BAUMGARTENER et al., 1975).

A transmissão do agente entre animais ocorre através de linfócitos infectados ou de secreções, podendo acontecer de forma horizontal ou vertical (DIGIACOMO, 1992a,b; LUCAS et al., 1993). Na pecuária bovina atual, ela ocorre principalmente através de transferência iatrogênica de linfócitos infectados pelo uso indiscriminado de instrumentos sem a devida desinfecção (MONTI et al., 2006). Deste modo, é relatada uma maior prevalência em rebanhos de alta produção devido ao fato destes serem submetidos a manipulações mais intensas, apresentando, conseqüentemente, uma maior possibilidade de exposição às formas de disseminação horizontal da enfermidade (LASSAUZET et al., 1990; HOPKINS; DIGIACOMO, 1997; KOHARA et al., 2006).

Em condições propícias, insetos também foram responsabilizados pela transmissão (FREITAS; ROMERO, 1991; CARN, 1996; MORRIS et al., 1996). Partículas virais foram encontradas no colostro e no leite de fêmeas infectadas (BUEHRING et al., 1994), corroborando com a sugestão de que o vírus pode ser transmitido da mãe para o neonato através da amamentação (POLLARI et al., 1993; NAGY et al., 2006). Não obstante, não foi evidenciado o risco de transmissão aos embriões através de sêmen contaminado, quando observados os protocolos de produção de embriões aprovados internacionalmente (CHOI et al., 2002; WRATHALL et al., 2006).

O VLB infecta, principalmente, linfócitos B (SCHWARTZ et al., 1994), integrando-se, em lugares dispersos, ao seu genoma (KETTMANN et al., 1979), e está associado ao desenvolvimento de linfocitose persistente (LP) e linfossarcoma nestes animais (SCHWARTZ; LEVY, 1994).

Parodi (1987) observou que, na infecção pelo VLB, o animal pode apresentar-se com sorodiagnóstico positivo, sem a presença de LP (animal alinfocitótico) ou com sorodiagnóstico positivo apresentando LP, caracterizada por uma elevação crônica no número de linfócitos circulantes e encontrada em cerca de 30 a 70% dos bovinos infectados. Podem, ainda, em cerca de 0,1 a 10% dos animais infectados, desenvolver manifestações tumorais (linfossarcomas), caracterizadas por infiltração mononuclear em órgãos ricos em tecido linfóide, comumente os linfonodos, o baço, o coração, o útero, o abomaso, o fígado e/ou os rins, tendo previamente apresentado ou não LP.

O autor ressalva que a LP foi definida pelo Comitê Internacional sobre Leucose Bovina,

em 1968, como um aumento na contagem absoluta de linfócitos de três ou mais desvios-padrão acima da média normal determinada para aquela respectiva raça e grupo etário de animais em rebanhos livres de leucose. Ainda, o conceito de LP deve ser aplicado a um aumento no número de linfócitos circulantes que persiste por mais de três meses (MARSHAK; ABT, 1968 apud PARODI, 1987, p. 30).

Ainda segundo Parodi (1987), deve-se distinguir LP, um aumento persistente da contagem linfocitária normal no sangue de alguns animais infectados com o VLB e que não tem manifestações clínicas ou lesões detectáveis, de leucemia, que corresponde à presença de células tumorais detectáveis na corrente sangüínea. Para o autor, à época não existiam evidências para se considerar a LP como uma condição linfoproliferativa benigna associada à infecção pelo VLB ou como uma condição pré-tumoral.

Morfologicamente, linfócitos atípicos podem ser encontrados em leucogramas de animais apresentando LP, contudo, tais células podem, ocasionalmente, ser observadas em amostras obtidas de animais sadios ou de animais portadores de infecções diversas da LEB (COCKERELL; REYES, 2000).

A patogenia exata da infecção causada pelos deltaretrovírus ainda não foi completamente elucidada. Embora as principais células infectadas pelo HTLV sejam os linfócitos T (JOHNSON et al., 2001), enquanto aquelas primordialmente infectadas pelo VLB sejam os linfócitos B, supõe-se que a patogenia envolva elementos imunomoduladores semelhantes em ambas infecções (KABEYA et al., 2001).

Não foi observada viremia após a infecção pelo VLB (KLINTEVALL et al., 1997), mas, mesmo com a detecção de quantidades significativas e duradouras de anticorpos neutralizantes séricos dirigidos contra antígenos do núcleo (p 24) e da cápsula (gp 51) virais (VALIKHOV, 1976; MATTHAEUS et al., 1978; CUNHA et al., 1982), o vírus não é eliminado do organismo, protegendo-se no interior das células infectadas e sugerindo uma participação da imunidade celular do hospedeiro na evolução da enfermidade (SCHWARTZ; LEVY, 1994).

Na fase alinfocitótica (pela grande maioria dos autores erroneamente denominada de aleucêmica) da LEB, a persistência viral ocorre, possivelmente, através do controle da expressão de antígenos virais nas células infectadas, posto que há a eliminação de células que os expressam. Beyer et al. (2002) encontraram linfopenia nesta fase, com uma redução na quantidade de linfócitos B de animais infectados pelo VLB, quando comparada com aquela de animais soronegativos e de animais infectados apresentando linfocitose. Tal eliminação pode estar associada à atuação de linfócitos- $\gamma\delta$, induzidos pela ação do interferon- γ (INF- γ).

Murakami et al. (2004), após inoculação intraperitoneal de IFN- γ , observaram um aumento na quantidade de linfócitos- $\gamma\delta$ circulantes, uma diminuição do número de linfócitos apresentando imunoglobulina M de superfície (IgM⁺) e uma supressão da replicação viral *in vitro* em células de bovinos infectados. Já Lundberg e Splitter (2000) haviam concluído que linfócitos- $\gamma\delta$ reconhecem o antígeno do VLB expressado em células infectadas, sem a necessidade de interações clássicas com o complexo de histocompatibilidade principal (MHC), apenas em animais infectados alinfocitóticos.

Por outro lado, Pyeon e Splitter (1998) encontraram uma maior expressão do RNA mensageiro (RNAm) que codifica a interleucina-12 (IL-12) em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) dos bovinos infectados sem linfocitose do que naqueles que apresentavam linfocitose, sugerindo seu envolvimento na regulação do IFN- γ . Keefe et al. (1997a) já haviam demonstrado elevados níveis de expressão dos RNAm codificando tanto interleucina-12 (IL-12) quanto INF- γ em animais que se encontravam nesta fase da infecção.

Evadindo-se desta resposta inicial do hospedeiro, em que há um balanço entre a infecção de novos linfócitos B e a eliminação de células que expressam antígenos virais, o animal pode permanecer nesta fase da infecção até que apresente LP e/ou linfossarcoma. No entanto, a sequência de eventos que leva a alterações do número de linfócitos circulantes ou ao desenvolvimento de linfossarcoma decorrentes da infecção pelo VLB também é pouco conhecida. Não está suficientemente claro se tais alterações são devidas à interação direta entre o vírus e a célula ou se elas são parcialmente induzidas por substâncias imunomoduladoras, como as citocinas (KEEFE et al., 1997a,b; KABEYA et al., 1999; AMILLS et al., 2004).

Sabe-se que o provírus integra-se ao material genético dos linfócitos B e supõe-se que seu potencial infectivo esteja ligado à multiplicação destas células (FULTON JR. et al., 2006). Por outro lado, os vírus desenvolveram estratégias para neutralizar a resposta apoptótica das células do hospedeiro e acredita-se que a modulação da apoptose, associada ou não a um aumento na taxa da proliferação celular, possa ser um componente fundamental na persistência viral e na progressão para a linfocitose induzida pelos retrovírus (DEBACQ et al., 2002).

Konnai et al. (2006) demonstraram que as CMSP de animais infectados apresentam proliferação espontânea *in vitro* dependente de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e que estas expressam maior quantidade de RNAm do TNF- α do que aquelas sem proliferação espontânea coletadas de animais não infectados pelo VLB. Ainda, os autores haviam demonstrado que esta proliferação é maior nas células de animais apresentando LP do que

naquelas dos alinfocitóticos ou dos soronegativos e que elas expressavam maiores níveis de RNAm do receptor II do TNF- α , que induz resposta celular proliferativa (KONNAI et al., 2005).

Por sua vez, Debacq et al. (2003) haviam verificado que a taxa de morte celular de linfócitos B de animais com LP era reduzida em relação à dos animais alinfocitóticos, e que a proliferação destas células também se encontrava reduzida, porém em menor grau.

Amills et al. (2002) encontraram uma menor expressão do RNAm codificando IFN- α , IL-2 e IL-4 em CMSP de animais com LP do que nas de animais alinfocitóticos, bem como Yakobson et al. (2000) e Pyeon et al. (1996) haviam observado que ocorre um aumento na expressão do RNAm que codifica a IL-10 destas células, sugerindo que a alteração de resposta imune celular (Th-1) para humoral (Th-2) possa estar envolvida com a progressão da enfermidade.

O efeito da infecção pelo VLB na função das diferentes populações de leucócitos, assim como um possível papel no desencadeamento de outras doenças oportunistas, também não está claro. Sugere-se, destarte, que possa haver algum tipo de imunossupressão em animais com LEB, que, associada aos vários fatores de estresse advindos do manejo dos rebanhos bovinos, pode aumentar a suscetibilidade do animal a outras infecções, contribuindo para sua baixa produção (FLAMING et al., 1997). Por outro lado, supõe-se, também, que infecções intercorrentes possam auxiliar nas sucessivas replicações do VLB no organismo do hospedeiro, podendo contribuir para a manutenção do estado de imunossupressão (TRAININ et al., 1996).

Buscando elucidar a questão da suposta imunossupressão, autores passaram a investigar funções inerentes aos linfócitos B, principais células envolvidas na infecção pelo VLB. Heeney et al. (1988) relataram uma menor produção total de imunoglobulinas séricas em bovinos infectados apresentando linfomas, porém comparando apenas com aqueles que não apresentavam a forma tumoral, independente dos resultados do leucograma. Já Gatei et al. (1990), investigando bovinos pertencentes a diferentes raças, encontraram uma menor concentração sérica de IgM em animais apresentando LP do que naqueles sem linfocitose e destes em relação a animais com sorodiagnóstico negativo, contudo, as concentrações séricas de IgG1 e IgG2 não diferiram entre os grupos.

Já Teutsch e Lewin (1996) observaram uma expressão alterada no RNAm relacionado à transcrição de imunoglobulinas em linfócitos B de vacas infectadas pelo VLB com LP em relação àqueles obtidos de bovinos com contagem linfocitária normal, infectados ou não, o que veio a ser corroborado pelas observações feitas por outros autores que verificaram

alterações funcionais em imunoglobulinas de animais infectados (LEVKUT et al., 1997).

No Brasil, Garcia (1992), não observou alterações na produção de anticorpos contra o vírus da febre aftosa entre animais com sorodiagnóstico negativo e positivo sem linfocitose e com linfocitose moderada e acentuada, contudo, não verificou a ocorrência de LP e, utilizando-se de micro-soroneutralização após o desafio, não aferiu as diferentes classes de imunoglobulinas. Em 2001, Birgel Júnior também observou que a concentração sérica das imunoglobulinas IgG e IgM dos animais não reagentes ao VLB foi semelhante àquela encontrada nos animais reagentes sem LP e nos que apresentavam LP.

Embora o VLB infecte principalmente linfócitos B, assim como em outras infecções por retrovírus (por exemplo, na infecção pelo HIV e na infecção pelo vírus da imunodeficiência felina – FIV), células da linhagem monócito/macrófago apresentam um papel importante como reservatórios virais (ALTREUTHER et al., 2001). Além disso, células desta linhagem possivelmente podem atuar na patogênese de infecções por retrovírus também por sua função como produtores de citocinas, como IL-1 e TNF, podendo, assim, contribuir para a evolução da enfermidade (MEIROM et al., 1997).

Em vista disso, a possibilidade de que outros tipos celulares sejam susceptíveis à infecção pelo VLB vem sendo estudada por alguns autores. Heeney et al. (1992) relataram evidências de que monócitos purificados por aderência continham o provírus em bovinos infectados naturalmente. Por sua vez, Mirsky et al. (1996) também encontraram monócitos infectados, mas, utilizando-se de citometria de fluxo, não puderam afirmar que não se tratava de contaminação por linfócitos B infectados, visto que as porcentagens celulares foram semelhantes.

Doménech et al. (2000), infectando macrófagos bovinos *in vitro*, observaram que, embora apresentando poucas alterações estruturais, tais células expressavam diversas proteínas virais, indicando replicação viral.

Seguindo este ensejo, Werling et al. (1995) demonstraram que a infecção pelo VLB altera a produção e a atividade de citocinas de monócitos após estimulação *in vitro* com lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli*. Os autores observaram produção de IL-1 quatro vezes maior no sobrenadante de culturas de monócitos obtidos de vacas infectadas com LP, porém com atividade diminuída em cerca de 30%, quando comparada com o sobrenadante de culturas de monócitos obtidos de vacas soronegativas. Por outro lado, o TNF do sobrenadante de culturas de monócitos obtidos de vacas soropositivas apresentou atividade cerca de cinco vezes maior do que aquele obtido no sobrenadante de culturas de monócitos obtidos de vacas soronegativas.

Altreuther et al. (2001) também conseguiram infectar monócitos bovinos *in vitro*, entretanto, não encontraram alterações na expressão de seus antígenos de superfície, bem como na transcrição de certas citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12).

Werling et al. (1998), investigando o efeito da infecção pelo VLB na função fagocítica de monócitos, observaram maior expressão de antígenos de superfície de monócitos, que apresentavam, contudo, menor índice de fagocitose mediada pelo receptor Fc γ , em células obtidas de bovinos naturalmente infectados.

Os sintomas decorrentes da infecção relatados advêm do desenvolvimento de linfossarcoma. Tornam-se evidentes quando os tumores invadem os diferentes tecidos e são dependentes do órgão envolvido, podendo abranger aumento do volume de linfonodos, inapetência, perda de peso e diminuição na produção (PARODI, 1987). Em decorrência das formações tumorais, são relatados, também, abortamento, partos laboriosos, paresias ou paraplegias e exoftalmia (BURNY et al., 1985).

Deste modo, perdas econômicas diretas decorrentes da LEB são evidenciadas, principalmente, em rebanhos que contenham animais apresentando manifestações tumorais e são devidas à redução da produção de leite e do ganho de peso, à invariável condenação das carcaças, aos custos com a reposição e ao aumento dos custos com serviços veterinários (THURMOND et al., 1985; THURMOND, 1987; D'ANGELINO et al., 1998b; CHI et al., 2002; OTT et al., 2003; RHODES et al., 2003a,b). Perdas indiretas são decorrentes da restrição no comércio de animais ou de seus produtos (BIRGEL et al., 1983; JOHNSON; KANEENE, 1991b; PELZER, 1997; OIE, 2006).

A descoberta do VLB em células epiteliais mamárias de vacas infectadas levantou a possibilidade de que o vírus pode induzir alterações nestas células (BUEHRING et al., 1994). Assim, Motton e Buehring (2003) sugeriram que os efeitos da infecção pelo VLB na produção de leite podem estar relacionados não exclusivamente aos danos à saúde geral do animal, mas também serem mediados diretamente por danos celulares, posto que encontraram um aumento nas taxas de crescimento e na longevidade de células epiteliais mamárias infectadas, com alteração na sua diferenciação normal e inibição na produção de caseína. Convém observar que, no Brasil, D'Angelino et al. (1998b) constataram uma menor produção de leite (11,0%) em animais reagentes, não confirmando, entretanto, a influência da infecção no intervalo entre partos, no coeficiente de natalidade, na frequência de descarte dos animais e no motivo do descarte.

O diagnóstico da LEB foi primeiramente estabelecido através de alterações hematológicas, baseado no número absoluto de leucócitos e relativo de linfócitos, visto que

era considerado que a leucocitose com linfocitose e presença de linfócitos atípicos permitiria o diagnóstico precoce da enfermidade, levando-se em consideração a influência de fatores regionais, da idade e das condições gerais de saúde (WITTMANN; SEILS, 1969). Deste modo, muitos estudos foram feitos com o intuito de se estabelecer o comportamento hematológico em animais infectados e, assim, uma chave leucométrica para o diagnóstico da LEB (KUPSCH; MIETH, 1970; CAKALA, 1971; GONYE; HORVATH, 1971; LALOV, 1971; FLENSBURG; WILLEBERG, 1976). Contudo, sabe-se que as alterações leucocitárias ocorrem em cerca de 30 a 70% dos animais infectados, incorrendo na obtenção de um grande número de resultados falso negativos, e que tais alterações também ocorrem em outras situações, inclusive na higidez, obtendo-se muitos resultados falso positivos (NAGY et al., 2002; KALE et al., 2005).

Atualmente, a LEB pode ser diagnosticada por métodos sorológicos e de isolamento, como imunodifusão em agar gel (IDAG) ou ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA), para o sorodiagnóstico, ou reação em cadeia da polimerase (PCR), para a detecção direta do genoma viral ou de seu provírus (BIRGEL, 1982; GUTIERREZ et al., 2001; NAGY et al., 2003; MONTI et al., 2005).

Apesar de alguns estudos pautados na atividade anti-retroviral de determinadas substâncias, ou mesmo no controle do desenvolvimento tumoral (ONUMA et al., 1989; OHISHI; IKAWA, 1996; WATARAI et al., 1997; FERENS et al., 2006; SI et al., 2006), não há, até o momento, possibilidade de tratamento para deltaretrovirose. Não obstante, a maioria dos animais com LEB permanece assintomática, atuando como reservatório do vírus. Assim, os esforços devem ser concentrados no controle da afecção (DIGIACOMO, 1992a; CORDEIRO et al., 1994; MOLLOY et al., 1994).

Posto que a utilização de vacinas para o controle da LEB ainda não apresenta resultados consistentes (VON BEUST et al., 1999; MATEO et al., 2001; USUI et al., 2003), entende-se que a detecção e a identificação dos bovinos sororreagentes positivos aos antígenos do VLB e sua retirada dos rebanhos ainda seja o princípio fundamental para se evitar a disseminação da enfermidade (BIRGEL et al., 1983; THURMOND, 1991; WANG; ONUMA, 1992).

2.2 LEUCÓCITOS E DEFESA IMUNOLÓGICA

Os microrganismos com os quais, constantemente, um indivíduo saudável se depara,

apenas ocasionalmente causam enfermidades perceptíveis. A maior parte é detectada e destruída em minutos ou horas por mecanismos de defesa que não requerem um longo período de indução, visto que não necessitam da expansão clonal antígeno-específica de linfócitos.

Esta defesa primária contra patógenos envolve mecanismos físicos e imunológicos (ALBERTS et al., 2002). Transpassadas as barreiras físicas naturais e iniciada a replicação do microrganismo nos tecidos do hospedeiro, mecanismos imunológicos ditos inatos atuam quase que imediatamente. Paralela a esta primeira tentativa de eliminação do patógeno é estimulada uma resposta imunológica adaptativa, com a geração de células efetoras antígeno-específicas e de células de memória que podem prevenir uma reinfecção pelo mesmo microrganismo (ABBAS et al., 1997). Não obstante, salienta-se que esta resposta adaptativa necessita (e, até, depende) de muitos dos mecanismos efetores utilizados pelo sistema imunológico inato (JANEWAY et al., 2004).

A patogenicidade dos microrganismos está, pelo menos em parte, relacionada a sua habilidade em resistir aos mecanismos envolvidos na imunidade inata (ABBAS et al., 1997).

Em infecções tissulares, caso um microrganismo consiga suplantar as linhas de defesa iniciais, ele é imediatamente reconhecido por macrófagos residentes, iniciando uma resposta inflamatória, caracterizada por dor, rubor, calor e edema no local da infecção, causadas por alterações na circulação sangüínea local (JANEWAY et al., 2004). Os vasos sangüíneos locais dilatam-se e tornam-se permeáveis a fluidos e proteínas. Ao mesmo tempo, as células endoteliais são estimuladas a apresentar proteínas de adesão celular que facilitam a ligação e promovem a migração de leucócitos sangüíneos, incluindo neutrófilos, linfócitos e monócitos (ABBAS et al., 1997).

A resposta inflamatória assim deflagrada é mediada por uma grande variedade de moléculas sinalizadoras, tais como prostaglandinas e citocinas, algumas das quais com funções quimiotáticas (ROITT et al., 1985). Algumas delas atraem neutrófilos, o segundo maior grupo de fagócitos do organismo. Abundantes na circulação, mas não presentes em tecidos sadios, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas em grande número para o local da nova infecção. Mais tarde, são atraídas outras células, tais como células dendríticas e mais monócitos, que darão origem a novos macrófagos (ALBERTS et al., 2002).

Assim, as células envolvidas com a defesa imunológica estão habitualmente presentes como células circulantes no sangue e na linfa e como células residentes em virtualmente todos os tecidos (ABBAS et al., 1997). Não obstante, sua habilidade em circular entre o sangue, a linfa e os tecidos é de fundamental importância para a geração da resposta imune.

Deste modo, os macrófagos são os primeiros fagócitos a encontrar microrganismos invasores dos tecidos, mas eles são rapidamente reforçados pelo recrutamento de um grande número de neutrófilos para o local da infecção. Os fagócitos reconhecem os patógenos através de seus receptores de superfície, que discriminam as moléculas de superfície de células estranhas daquelas apresentadas por células do hospedeiro, ou que reconhecem patógenos opsonizados por moléculas do sistema complemento, que também é rapidamente ativado assim que ocorra invasão dos tecidos (ABBAS et al., 1997).

A ligação de muitos dos receptores de superfície celular que reconhecem os patógenos pode levar à fagocitose destes microrganismos, seguida por sua morte dentro do fagócito. Esta fagocitose é um processo ativo por meio do qual o patógeno é internalizado para dentro de uma vesícula, conhecida como fagossomo (TIZARD, 2002). Além de possuir atividade fagocítica, macrófagos e neutrófilos contêm lisossomos, grânulos intracelulares preenchidos por enzimas líticas e peptídeos antimicrobianos, envolvidos na morte e na digestão enzimática do microrganismo ingerido (ALBERTS et al., 2002). O fagossomo recém-formado acidifica seu conteúdo e funde-se a um ou mais lisossomos, gerando o fagolisossomo, dentro do qual o conteúdo lisossômico atua na destruição do patógeno, alterando a integridade de sua membrana plasmática ou envelope viral (THOMAS et al., 1988).

A interação bidirecional entre a resposta imunológica inata e a adaptativa é fundamental para sua função normal. A imunidade inata participa no desencadeamento e na regulação da imunidade específica, por meio da apresentação de antígenos aos linfócitos T e da liberação de moléculas sinalizadoras. Por outro lado, as respostas específicas potencializam os mecanismos de defesa utilizados pelas células componentes da imunidade inata, por meio da liberação de citocinas (ABBAS et al., 1997).

Linfócitos T apenas reconhecem e respondem a peptídeos antigênicos estranhos quando estes estão ligados à superfície de outras células. Nestas células ocorre o processamento de proteínas antigênicas em fragmentos de peptídeos, que são apresentadas aos linfócitos em associação ao MHC de classe II, proteínas integrantes da membrana plasmática de células apresentadoras de antígenos (APCs). Segundo Abbas et al. (1997), a maior parte das células de mamíferos parece ser capaz de fagocitar e digerir antígenos protéicos, entretanto, apenas células dendríticas, fagócitos mononucleares e linfócitos B normalmente expressam o MHC de classe II e, deste modo, são freqüentemente denominadas de APCs “profissionais”.

Em bovinos, como em outras espécies de vertebrados, neutrófilos e macrófagos são os principais tipos celulares fagocíticos (GODDEERIS, 1998). Os ruminantes têm uma menor porcentagem de neutrófilos no sangue periférico, quando comparados aos carnívoros,

constituindo cerca de 20% a 30% dos leucócitos sangüíneos (TIZARD, 2002). Além disso, neutrófilos de ruminantes possuem um exclusivo terceiro tipo de grânulo em seu citoplasma, cujo conteúdo é rico em peptídeos catiônicos antibacterianos, tais como bactericinas, indolicidinas e β -defensinas. Entretanto, eles não contêm lisosimas, o principal componente dos grânulos de neutrófilos humanos (GODDEERIS, 1998). Por outro lado, ruminantes possuem uma maior porcentagem de macrófagos pulmonares intravasculares, quando comparados, por exemplo, a eqüinos, humanos e cães, principais responsáveis pela eliminação de bactérias da circulação e de material particulado (WINKLER, 1988).

As quantidades de leucócitos circulantes consideradas normais para bovinos diferem entre os vários relatos. Tais divergências são devidas, principalmente, a diferentes técnicas empregadas e a variações fisiológicas e ambientais, tais como estresse, atividade muscular, higidez, horário da coleta, temperatura ambiente, altitude, qualidade nutricional, idade média e, possivelmente, raça e sexo (JAIN, 1986; KRAMER, 2000).

Embora a maior parte dos linfócitos residam dentro de órgãos linfóides (HARVEY, 2001), em leucogramas de bovinos adultos, são a população de leucócitos predominante (JAIN, 1986). Eles variam entre 8 e 15 μ m de diâmetro (KRAMER, 2000). Jain (1986) e Kramer (2000) classificam os linfócitos bovinos, avaliados em hemogramas, em:

- linfócitos pequenos, com núcleo arredondado e fortemente corado, nos quais a relação núcleo:citoplasma (N:C) é de, praticamente, 1:0. Kramer (2000) os considera linfócitos “metabolicamente dormentes” ou, pelo menos, menos ativos;
- linfócitos médios, com núcleo arredondado que pode encerrar pequenas projeções, de coloração menos intensa, contendo regiões de cromatina densamente corada e regiões com paracromatina de coloração menos intensa. Estas células apresentam pequena quantidade de citoplasma de coloração pálida;
- linfócitos grandes, com núcleo excêntrico de coloração menos intensa e uma menor relação N:C. Seu citoplasma, de coloração pálida, geralmente envolve todo o núcleo e apresenta, eventualmente, uns poucos vacúolos pequenos. Algumas células podem conter núcleo em forma de rim, ou de feijão, e são denominadas de células “Rieder”. Para Jain (1986), tais células são mais encontradas em amostras obtidas de animais com leucemia linfocítica.

Segundo Jain (1986), linfócitos de tamanho maior, com citoplasma basofílico ou cromatina frouxa têm características de células relativamente imaturas. Estas características revertem-se quando os linfócitos são estimulados *in vitro* após um período de incubação.

Ainda, Jain (1986) cita a possibilidade da observação esporádica de grânulos

azurofílicos, de tamanho, número e formas variáveis, no citoplasma de alguns linfócitos grandes. Wellman (2000), Kramer (2000) e Harvey (2001) denominam tais células de linfócitos grandes granulares. Segundo Wellman (2000) e Harvey (2001), a imunofenotipagem destas células evidencia que algumas delas parecem ser linfócitos T citotóxicos ativados, enquanto outras parecem ser células NK.

De acordo com Kramer (2000), a presença destes grânulos identifica os linfócitos grandes em bovinos. Segundo Jain (1986) e Kremer (2000), linfócitos maiores são denominados de células de transição, posto que podem ser confundidos com monócitos. Ainda, para Kremer (2000), linfócitos grandes agranulares apenas são diferenciáveis de monócitos por meio de colorações imunocitoquímicas.

Segundo Harvey (2001), uma LP, com alguns linfócitos de aparência normal e alguns linfócitos reativos, pode estar presente em animais com viremias crônicas, das quais a mais comum seria a LEB. Para o autor, linfócitos reativos, caracteristicamente os linfócitos grandes agranulares de Kramer (2000), são linfócitos proliferando em resposta a estímulo antigênico.

Aliado à fagocitose, as células fagocíticas produzem uma variedade de radicais oxidativos, diretamente tóxicos para as bactérias e outros microrganismos, colaborando na destruição do agente englobado (JANEWAY et al., 2004).

Neutrófilos morrem após a fagocitose e conseqüente destruição do patógeno; macrófagos, contudo, têm um longo período de vida, gerando novos lisossomos e mantendo-se aptos a novos processos fagocíticos. Caso um patógeno seja muito grande para ser fagocitado com sucesso, um grupo de macrófagos, neutrófilos ou eosinófilos irá envolvê-lo. Tais células irão secretar seus produtos lisossomais por exocitose, além de liberar, para o meio extracelular, os radicais oxidativos originados (ABBAS et al., 1997).

A função dos leucócitos, em bovinos, pode estar deprimida em bezerros e em vacas, durante o período puerperal (HAMMON et al., 2006). Do mesmo modo, sabe-se que a presença de certos agentes infecciosos, terapia com glicocorticóides, estresse, nutrição inadequada e defeitos genéticos podem debilitar a função fagocítica destas células (GODDEERIS, 1998). Por outro lado, sua atividade pode ser avultada na presença de diversas citocinas liberadas, principalmente, por macrófagos e linfócitos, como o TNF- α , que ativa sua citotoxicidade independente da presença de anticorpos (JANEWAY et al., 2004).

2.2.1 Produção de radicais oxidativos

O aparecimento de organismos aeróbios, há cerca de 2,4 bilhões de anos, é considerado um marco na história da evolução biológica (SILVEIRA, 2004). A utilização de oxigênio (O_2), como aceptor final de elétrons no processo de fosforilação oxidativa aumentou a eficiência na produção de energia a partir de alimentos.

Durante a fosforilação oxidativa, a redução do O_2 molecular para H_2O requer quatro elétrons e pode ocorrer por duas vias. Por um lado, pode advir da cadeia mitocondrial de transportes de elétrons, em uma reação catalisada pela enzima citocromo oxidase e, com a qual, nenhum intermediário de O_2 é formado. Por esta via, de redução tetravalente do O_2 , aproximadamente 95 a 98% do O_2 consumido é reduzido (ERNSTER, 1986).

Em uma segunda via, os 2 a 5% restantes podem dar origem aos radicais oxidativos (também chamados de “espécies reativas de oxigênio” – EROs) por meio de redução univalente do O_2 (SILVEIRA, 2004).

Os radicais oxidativos mais comuns, assim formados, são o radical ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) classificados como radicais livres de O_2 posto que apresentam um elétron desemparelhado em suas estruturas atômicas, além do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (ΔGO_2), classificados, simplesmente, como EROs (YU, 1994).

Entre os radicais oxidativos, considera-se o $^{\bullet}OH$ o oxidante mais potente em sistemas biológicos, visto que apresenta tempo de atuação extremamente curto (1×10^{-9} segundos) e alta reatividade com uma ampla variedade de moléculas orgânicas (YU, 1994).

Muito embora a cadeia mitocondrial de transporte de elétrons seja o principal local de produção de radicais oxidativos, os fagócitos podem gerar grandes quantidades destes radicais por meio da ação do complexo enzimático fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) oxidase, localizado na superfície celular, num processo conhecido por explosão respiratória, posto que é acompanhado por um aumento transitório do consumo de oxigênio em quase 100 vezes (JANEWAY et al., 2004). O processo envolve a ação da enzima proteína quinase C (PKC), para a qual, a ativação da enzima tirosina quinase (PTK), cuja expressão está restrita aos fagócitos, é um elemento chave (WELCH et al., 1996; HODGSON et al., 2006).

O produto primário deste sistema de oxidase é o oxigênio reduzido em um elétron, ou seja, O_2^- , que, em sua maior parte, é convertido, pela ação da superóxido dismutase (SOD), em H_2O_2 (BABIOR, 1984). Por meio de via não enzimática, o H_2O_2 é convertido em $^{\bullet}OH$, em uma reação catalisada pelo Fe^{2+} . Por outro lado, dentro do fagolisossomo, a enzima

mieloperoxidase (MPO) e o H_2O_2 formam um complexo com o potencial de reagir com íons cloreto, produzindo grande quantidade de agentes tóxicos antimicrobianos, tais como o ácido hipocloroso, que ataca o patógeno diretamente ou reage com compostos intermediários do nitrogênio formando compostos altamente reativos, como as cloraminas (SHEPHERD, 1986).

Segundo Silveira (2004), outras fontes de radicais oxidativos incluem: i) peroxissomos, nos quais ocorre a formação de H_2O_2 quando ácidos graxos de cadeias longas são metabolizados via β -oxidação; ii) isquemia, quando a molécula de AMP é continuamente degradada a hipoxantina, podendo ser, em seguida, convertida em xantina e ácido úrico por ação da xantina oxidase, que utiliza o O_2 como aceptor final de elétrons, formando O_2^- ; iii) hemáceas, quando da metabolização de oxihemoglobina- Fe^{2+} em desoxihemoglobina- Fe^{3+} ; iv) por meio do citocromo P450; ou v) na via de formação do ácido araquidônico.

Outra importante espécie reativa é o óxido nítrico (NO), originado, por sua vez, do nitrogênio e, deste modo, classificado como espécie reativa do nitrogênio (ERN). Ele é considerado um mensageiro celular com funções neurotransmissora, vasodilatadora, imunológica e metabólica (BREDET, 1999). Gerado a partir da arginina e O_2 , por ação de três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS), é menos reativo que o ^-OH . Entretanto, sua interação com o O_2^- produz o peróxido nítrico (ONOO^-), outra ERN, capaz de se decompor, produzindo potentes oxidantes em pH fisiológico (SILVEIRA, 2004).

Conquanto os fagócitos utilizem o potencial oxidante dos radicais oxidativos na remoção de patógenos, altos níveis de EROs e de ERNs podem causar efeito deletério no organismo, conhecido como estresse oxidativo, em que lipídios, proteínas e ácidos nucleicos podem sofrer oxidação, comprometendo as principais funções celulares (YU, 1994). No entanto, as células possuem sistemas de proteção antioxidante enzimáticos e não enzimáticos, que, em conjunto, minimizam os efeitos indesejáveis dos radicais oxidativos nos tecidos.

O sistema antioxidante enzimático envolve as enzimas SOD, glutathione peroxidase (GSH-PX), glutathione reductase (GSSG-GR) e a catalase (CAT), que são, respectivamente, responsáveis pela remoção do O_2^- , de hidroperóxidos orgânicos e do H_2O_2 . Já o sistema não enzimático abrange, principalmente, as vitaminas E, C e A, a glutathione reduzida (GSH), a ubiquinona, o ácido úrico, a L-cisteína, a fenilalanina e a glicose (YU, 1994).

Salienta-se que o ^-OH , o NO e o ONOO^- não possuem enzimas antioxidantes específicas. Assim, suas concentrações tissulares são reguladas pelos níveis de O_2^- disponíveis (KOOY et al., 1997).

2.3 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE OXIDATIVA

A atividade oxidativa de leucócitos pode ser monitorada a partir de ensaios de consumo de oxigênio, *shunt* de hexose monofosfato (HMPS), geração de radicais oxidativos, geração de produtos reduzidos (por exemplo, iodinação protéica ou redução do corante tetrazólio – NBT) ou por ensaios de quimioluminescência (BABIOR, 1978a,b; DECHATELET, 1978; SZEJDA et al., 1984; FLAMINIO et al., 2002; HODGSON et al., 2006). Para tanto, geralmente, faz-se necessário o isolamento destas populações celulares, que pode representar uma fonte de variação entre os ensaios (KAMPEM et al., 2004b), e assume-se que as células assim isoladas respondem de maneira homogênea (BASS et al., 1983).

O ensaio ideal para a avaliação da atividade oxidativa de leucócitos deve requerer um pequeno volume de sangue, ser tecnicamente simples e prover resultados quantitativos e qualitativos de um grande número de células individualmente, sem a necessidade de prévio isolamento das populações leucocitárias (VOWELLS et al., 1995). Destarte, métodos fluorescentes são considerados ferramentas promissoras para revelar os papéis biológicos de diversas moléculas e, mais especificamente, para monitorar a produção de radicais oxidativos em diferentes populações celulares, provenientes de diferentes tecidos. Soh (2006) realizou ampla revisão acerca dos métodos fluorescentes utilizados para a detecção específica dos diferentes radicais oxidativos.

O citômetro de fluxo é um aparelho utilizado para a avaliação qualitativa e quantitativa de células em suspensão (ROITT et al., 1985). Para tal, baseando-se no uso de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, mecanismos ópticos e de recursos de informática, fornece informações acerca do tamanho relativo das células (*forward scatter characteristic* – FSC) e de sua granulosidade ou complexidade interna (*side scatter characteristic* – SSC), permitindo que as mesmas sejam agrupadas em populações conforme seus parâmetros morfológicos. Ainda, possibilitam a mensuração da fluorescência emitida pelas células individualmente (MCCOY, 1994).

Já em meados da década de 1960, Brandt e Keston (1965) utilizaram o diacetato de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) para medir H_2O_2 em soluções aquosas, especialmente em fluidos sobrenadantes de cultivos celulares. Menos de vinte anos depois, Bass et al. (1983) foram os primeiros a aplicar este método à análise, por citometria de fluxo, da geração de H_2O_2 por neutrófilos.

Por ser o grupo diacetato apolar, o DCFH-DA difunde-se através da membrana celular

em diferentes tecidos e, no citoplasma, é hidrolizado por esterases, deixando livres as moléculas de DCFH. Por serem, por sua vez, polares, estas moléculas permanecem no interior da célula e tornam-se substratos para o H_2O_2 gerado durante o metabolismo oxidativo. Esta oxidação gera 2,7-diclorofluoresceína (DCF), um produto intracelular altamente fluorescente (BASS et al., 1983).

A fluorescência produzida pelo DCF é diretamente proporcional à atividade do metabolismo respiratório e parece ser mediada apenas pelo H_2O_2 (HIRABAYASHI et al., 1985). Deste modo, utilizando-se de citometria de fluxo para mensurar a fluorescência de cada célula, o ensaio com DCF pode prover a quantificação da atividade oxidativa em células individuais (BASS et al., 1983).

Ressalta-se que, apesar de resultados divergentes no tocante à especificidade do DCFH pelo H_2O_2 (BASS et al., 1983; RAO et al., 1992; WALRAND et al., 2003; KIM et al., 2006; SOH, 2006), resultados *in vitro* evidenciaram uma baixa especificidade pelos demais radicais (SILVEIRA, 2003).

Dihidro-compostos semelhantes, tais como a dihidrorodamina 123 (DHR123), a dihidrorodamina 6G (DHR6G), o diacetato de 4,5-Diaminofluoresceína (DAF-2-DA), a dihidrocalceína AM, e o dihidroetídio (hidroetidina) também são utilizados como sondas fluorescentes na detecção de radicais oxidativos. Entretanto estes compostos são altamente fotossensíveis, gerando ampla fluorescência na ausência de radicais oxidativos, além de apresentarem baixa especificidade, reagindo com diversos tipos de radicais oxidativos (WALRAND et al., 2003; SOH, 2006).

Tais ensaios podem ser realizados após estímulo com ativadores, solúveis ou particulados, da produção de radicais oxidativos (WATSON et al., 1995). Estes estímulos incluem bactérias opsonizadas ou não (como *Staphylococcus aureus* conjugados com iodeto de propídio – SaPI), partículas como *zymosan*, proteínas surfactantes, citocinas, componentes da cascata do complemento, LPS (ou endotoxinas) de *Escherichia coli* ou 12-miristato 13-acetato de forbol (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* – PMA), um ativador da PKC (HODGSON et al., 2006).

A interação destes ativadores com receptores da membrana plasmática dos fagócitos ou com o citocromo b558, dentro de grânulos citoplasmáticos, induz o aumento do consumo celular de O_2 pelo complexo NADPH oxidase (HODGSON et al., 2006).

A avaliação da capacidade fagocítica de leucócitos pode ser feita por meio da mensuração do número de células que realizam fagocitose e do número de partículas fagocitadas por célula, utilizando-se de microscopia óptica (VERHOEFF; WALDVOGEL,

1985). Também para este tipo de análise, tem sido utilizada, com vantagens, a citometria de fluxo (SZEJDA et al., 1984; VAN OOSTVELDT et al., 2002). A partir da fagocitose *ex vivo* de esferas de látex fluorescentes ou de bactérias ou leveduras conjugadas com marcadores fluorescentes, a citometria de fluxo permite a observação da proporção de células realizando fagocitose, bem como de sua intensidade. Além disso, tal metodologia mostra-se célere, necessitando de uma menor quantidade de células e dispensando a prévia separação das populações leucocitárias.

Não obstante a ampla variedade de métodos, utilizando-se de citometria de fluxo, para avaliar simultaneamente a fagocitose e o metabolismo oxidativo de células humanas (SILVEIRA, 2004; SOH, 2006), já utilizados, também, para a avaliação da resposta imune de eqüinos (FLAMINIO et al., 2002; MASSOCO; PALERMO NETO, 2003), poucos estudos foram realizados empregando-os para analisar leucócitos de bovinos (SMITS et al, 1997; KAMPEN et al., 2004a,b). Ainda, até onde se pôde verificar, não há relatos acerca da avaliação da influência da infecção pelo VLB na capacidade fagocítica e no metabolismo oxidativo de leucócitos, como medida da possível alteração imunológica decorrente da LEB.

3 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da infecção pelo VLB sobre a imunidade inata de fêmeas bovinas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. analisar a produção intracelular de H_2O_2 de leucócitos circulantes obtidos de fêmeas bovinas negativas no diagnóstico para LEB e de fêmeas bovinas naturalmente infectadas pelo VLB, alinfocitóticas e manifestando LP, frente diferentes estímulos *in vitro*;
- b. analisar a fagocitose *in vitro* de SaPI por leucócitos circulantes obtidos de fêmeas bovinas negativas no diagnóstico para LEB e de fêmeas bovinas naturalmente infectadas pelo VLB, alinfocitóticas e manifestando LP.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a seleção dos animais a serem utilizados e posterior composição dos grupos experimentais, inicialmente foram coletadas amostras sanguíneas de 99 vacas nas quais foi realizado o sorodiagnóstico para LEB e o hemograma.

Após intervalo de, aproximadamente, 90 dias, novas amostras sanguíneas foram coletadas para a verificação de possível soroconversão nos animais que obtiveram sorodiagnóstico negativo, na primeira coleta. Nesta coleta, também foi confirmado o diagnóstico de LP, nos animais em que, na primeira coleta, foi observada quantidade de linfócitos com três desvios padrão acima da média considerada como referência para sua idade.

Nesta ocasião, foram formados os grupos experimentais e novas amostras sanguíneas foram coletadas para os ensaios de produção intracelular de H_2O_2 e de fagocitose. Em três dos ensaios de produção de H_2O_2 , os leucócitos foram submetidos, previamente, a estímulos *in vitro*.

4.1 ANIMAIS EMPREGADOS

Em um primeiro momento, foram coletadas amostras sanguíneas de 99 fêmeas bovinas adultas em lactação. Estas fêmeas, com idade variando entre 30 e 72 meses, da raça Holandês Preto e Branco, eram oriundas de um único rebanho, localizado no Município de Santa Rita do Passa Quatro, Estado de São Paulo.

Os animais, apresentando bom estado nutricional, não haviam sido submetidos a tratamento com glicocorticóides nos últimos 30 dias, assim como não se encontravam em fase puerperal.

Dentre estes animais, foram selecionadas, por meio dos resultados do sorodiagnóstico para LEB e dos leucogramas, quinze fêmeas. Destas, foram obtidos os leucócitos empregados em quatro ensaios de produção de H_2O_2 e de fagocitose, por citometria de fluxo.

4.2 COLETAS DE SANGUE

Foi coletada de cada animal, por venopunção coccígea, utilizando-se de sistema a vácuo, uma amostra de sangue em tubo siliconizado sem anticoagulante, com capacidade de 10 mL. A amostra foi identificada e transportada sob refrigeração até o Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

O soro, obtido após centrifugação por 10 minutos a 3.000 rpm, foi conservado à temperatura de -20°C até a realização do sorodiagnóstico para LEB.

Para a realização do leucograma, foi também coletada, de cada animal, por venopunção coccígea, utilizando-se sistema a vácuo, uma amostra em tubo siliconizado com EDTA tripotássico na proporção de 1,5 mg/mL de sangue (capacidade para 5 mL), que também foi identificada e transportada, sob refrigeração, até o laboratório.

Como anteriormente citado, novas coletas foram realizadas, nos mesmos animais, cerca de noventa dias após a primeira, para a verificação de possível soroconversão e da persistência da linfocitose.

Após a triagem dos animais, foi também coletada, de cada animal selecionado, por venopunção coccígea, utilizando-se sistema a vácuo, uma amostra em tubo siliconizado com heparina (capacidade para 10 mL), que também foi identificada e transportada, sob refrigeração, até o laboratório. Destas amostras foram obtidos os leucócitos utilizados nos ensaios de produção de H₂O₂ e de fagocitose.

4.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

O número total de leucócitos por μ L de sangue foi mensurado através de contagem automática (ABC Vet[®] – ABX[™]) e a contagem diferencial foi feita por meio de esfregaços sangüíneos corados pela técnica de Rosenfeld (1947), sendo a diferenciação do padrão leucocitário feita em microscópio óptico, com aumento de 400X.

Foram considerados, como referência para as contagens leucocitárias dos animais, os dados obtidos por Távora (1998), adaptados de Garcia (1989) e Birgel Júnior (1991), apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Valores do leucograma¹ de fêmeas bovinas saudáveis, estratificadas segundo a idade, criadas no Estado de São Paulo, utilizados como referência no presente trabalho – São Paulo – 2007

Células	Idade (meses)			
	24 ± 36	36 ± 48	48 ± 60	60 ± 72
Leucócitos/mL	15.533 (± 4.846)	16.113 (± 5.571)	16.004 (± 7.517)	12.050 (± 3.151)
Neutrófilos/mL	3.797 (± 1.497)	4.145 (± 3.421)	3.443 (± 1.287)	3.033 (± 1.374)
Bastonetes/mL	80 (± 126)	174 (± 388)	53 (± 86)	91 (± 104)
Segmentados/mL	3.717 (± 1.479)	3.971 (± 3.154)	3.389 (± 1.297)	2.942 (± 1.362)
Eosinófilos/mL	1.320 (± 1.061)	1.079 (± 659)	1.656 (± 1.284)	1.145 (± 564)
Basófilos/mL	89 (± 112)	75 (± 105)	107 (± 130)	64 (± 106)
Linfócitos/mL	10.086 (± 4.316)	10.578 (± 5.094)	10.580 (± 6.813)	7.557 (± 2.759)
Linfócitos Pequenos/mL	5.893 (± 3.460)	6.407 (± 4.536)	6.501 (± 5.972)	4.564 (± 2.593)
Linfócitos Grandes/mL	2.073 (± 1.687)	1.964 (± 1.313)	2.025 (± 1.601)	1.557 (± 1.267)
Linfócitos Atípicos/mL	2.119 (± 1.194)	2.207 (± 1.192)	2.055 (± 1.390)	1.436 (± 608)
Monócitos/mL	275 (± 260)	243 (± 193)	252 (± 251)	262 (± 172)

¹ Valores expressos em número absoluto (± desvio padrão).

Fonte: Távora (1998).

4.4 SORODIAGNÓSTICO

Para a detecção dos anticorpos séricos específicos anti-VLB, foi empregada a técnica da Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony (imunodifusão em agar gel – IDAG), conforme preconizado pelo Escritório Internacional de Epizootias (OIE, 2006). Para tanto, foi utilizado o antígeno glicoprotéico (gp51) comercial, extraído do envelope do VLB.

4.5 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após a verificação de possível soroconversão e da persistência da linfocitose,

observando-se as indicações de Parodi (1987) e de Marshak e Abt (1968 apud PARODI, 1987, p. 30), os animais foram divididos segundo o resultado da sorologia e conforme o resultado do leucograma, nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo LP – animais com sorodiagnóstico negativo;
- Grupo AL – animais com sorodiagnóstico positivo, porém alinfocitóticos;
- Grupo LP – animais com sorodiagnóstico positivo apresentando LP.

4.6 PRODUÇÃO INTRACELULAR DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Os ensaios para a avaliação da produção intracelular de H_2O_2 foram feitos utilizando-se de técnicas empregadas por Hasui et al. (1989), que utilizaram amostras de sangue humano, e por Smits et al. (1997) e Kampen et al. (2004a,b), que avaliaram amostras de sangue bovino, com as seguintes modificações:

4.6.1 Preparo das amostras

Para cada amostra, seis tubos para citometria foram identificados com letras (A, B, C, D, E e F) e com a identificação do animal. Nestes tubos, foi colocado PBS gelado, conforme quantidades mostradas na figura 1. Além disso, em cada tubo, foi adicionado 100 μ L do sangue coletado. Nos tubos “B”, “D”, “E” e “F”, foi também adicionado 200 μ L de DCFH-DA. Já nos tubos “C” e “D”, foi adicionado 100 μ L de Sa-PI. No tubo “E”, foi adicionado 100 μ L de PMA. E no tubo “F”, 100 μ L de LPS.

Após a adição das substâncias, os tubos foram incubados em banho-maria, a uma temperatura de 37° C, sob ligeira agitação. Depois de 30 minutos de incubação, foi adicionado, em cada tubo, 2 mL de solução gelada de EDTA a 3 mM, para que as reações cessassem. A seguir, os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 1.200 rpm.

Para a lise dos eritrócitos, após desprezar-se o sobrenadante, foi adicionado a cada tubo 2 mL de NaCl a 0,2% e, esperados 20 segundos, 2 mL de NaCl a 1,6%, para a recomposição da solução fisiológica.

Repetiu-se a lise de eritrócitos e, após desprezar-se, mais uma vez, o sobrenadante, em

cada tubo foi adicionado 500 μL de PBS gelado. Os tubos assim preparados foram, então, levados imediatamente para a avaliação por citometria de fluxo.

Componente	Tubos					
	A	B	C	D	E	F
PBS gelado	1.000 μL	800 μL	900 μL	700 μL	700 μL	700 μL
Sangue heparinizado	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
DCFH	-	200 μL	-	200 μL	200 μL	200 μL
Sa-PI	-	-	100 μL	100 μL	-	-
PMA	-	-	-	-	100 μL	-
LPS	-	-	-	-	-	100 μL
Volume total	1,1 mL	1,1 mL	1,1 mL	1,1 mL	1,1 mL	1,1 mL

Figura 1 – Quantidades dos componentes utilizados por tubo, na avaliação da produção intracelular de peróxido de hidrogênio por citometria de fluxo – São Paulo – 2007

4.6.2 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio por citometria de fluxo

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Técnicas Imunológicas Aplicadas à Morfofisiologia do Departamento de Cirurgia (VCI), para serem analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur[®] (Becton Dickinson Immunocytometry System[™], San Diego, CA), ou ao Laboratório de Neuroimmunomodulação do Departamento de Patologia Experimental e Comparada, para serem avaliadas no citômetro de fluxo FACSCAN[®] (Becton Dickinson Immunocytometry System[™], San Diego, CA), ambos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Dez mil eventos de cada amostra foram adquiridos e analisados por meio do programa Cell Quest Pro[®] (Becton Dickinson Immunocytometry System[™], San Diego, CA). Os tipos celulares foram identificados quanto às suas características de FSC e SSC, que avaliam, respectivamente, o tamanho e a complexidade interna de cada célula.

Foi avaliada, também, a quantidade de células emitindo fluorescência e a intensidade de fluorescência média obtida após a oxidação, pelo peróxido de hidrogênio intracelular, do DCFH em DCF, com e sem o estímulo *in vitro* exercido pela fagocitose de Sa-PI, e pela adição de PMA ou de LPS. Para tal, foi utilizado o programa FlowJo[®], versão 7.1.3, (Tree Star[™], Inc., Ashland, OR).

Os resultados de fluorescência foram gravados em escala logarítmica. A fluorescência

verde da DCF foi mensurada a 530 ($\pm$ 30) nm (detector FL1) e a fluorescência vermelha do iodeto de propídio conjugado ao *S. aureus*, a 585 ($\pm$ 42) nm (detector FL2). A quantificação da capacidade de fagocitose, bem como as mensurações da atividade oxidativa por meio da produção de H₂O₂, foram feitas pela intensidade média da fluorescência emitida por célula. A porcentagem média de fagocitose foi calculada a partir do número de leucócitos emitindo fluorescência, dividido pelo número total de leucócitos por ensaio, multiplicados por 100.

As fluorescências emitidas pelo iodeto de propídio e pelo DCF foram avaliadas após compensação de fluorescência, corrigindo-se quaisquer interferências de sinais. Para tanto, para todos os ensaios, os aparelhos foram calibrados com o tubo A (Figura 1), em que não havia a adição de substâncias fluorescentes, como controle da refringência basal das células analisadas.

4.6.3 Reagentes utilizados

- **LPS** – lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* – cepa 055:b5 (SigmaTM, St. Louis, MO; n.º. cat. L-3129) – utilizado no ensaio com estímulo *in vitro* para produção de H₂O₂.
- **PMA** – 12-miristato 13-acetato de forbol (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*) (SigmaTM, St. Louis, MO; n.º. cat. P8139) – utilizado no ensaio com estímulo *in vitro* para produção de H₂O₂.
- **SaPI** – *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 25923) – a bactéria, conjugada com iodeto de propídio (SigmaTM, St. Louis, MO; n.º. cat. P4170), foi utilizada no ensaio com estímulo por meio de fagocitose *in vitro*, para a produção de H₂O₂, assim como para a avaliação da fagocitose por citometria de fluxo.
- **DCFH-DA** – Diacetato de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína (Molecular ProbesTM, Eugene, OR; n.º. cat. C1157) – empregado como reagente para a determinação da produção intracelular de H₂O₂, nos quatro ensaios por citometria de fluxo.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Conforme indicado por Callegari-Jacques (2003), foi verificada a normalidade da

distribuição dos resultados, utilizando-se do teste de Anderson-Darling, e sua homoscedasticidade, utilizando-se do teste F (para dados que apresentaram distribuição normal) ou do teste de Lavene (para dados que não apresentaram distribuição normal).

Para a análise das frequências observadas, foi utilizado o teste Qui-quadrado. Para a avaliação das diferenças entre as médias dos resultados obtidos, foram feitos os testes de análise de variância (One-way ANOVA) e de Tukey-Kramer ou o teste t (para dados com distribuição normal), e de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis (para dados que não apresentaram distribuição normal).

Para todos os resultados, foram consideradas significantes as análises que apresentaram $p \leq 0,05$. Os dados estão expressos como média ($\pm$ desvio padrão).

Nas avaliações estatísticas, foi utilizado o software estatístico MINITAB[®], versão 14.1 (GlobalTech Informática[™], Belo Horizonte, MG).

5 RESULTADOS

Foi verificada, no rebanho estudado, a presença de animais soropositivos para a LEB, bem como de animais apresentando LP. Tais resultados permitiram, por conseguinte, a seleção aleatória de vacas constituintes dos grupos experimentais, das quais amostras sanguíneas foram obtidas para a avaliação, por citometria de fluxo, da produção intracelular de H_2O_2 e da fagocitose *in vitro*.

Primeiramente, são apresentados os resultados relacionados à formação dos grupos experimentais (em função dos resultados da IDAG e do hemograma). A seguir, são descritos os resultados da citometria de fluxo (pautados por ensaio).

5.1 TRIAGEM E CONFIRMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram triadas 99 vacas pertencentes a um mesmo plantel, que atendiam aos critérios de inclusão amostral. Destas, 37 (37,37%) foram diagnosticadas, por IDAG, como positivas para LEB (Figura 2).

Figura 2 – Resultado da imunodifusão em gel de agar (IDAG) para diagnóstico de leucose enzoótica bovina em 99 vacas da raça Holandês Preto e Branco – São Paulo – 2007

Somando-se três desvios padrão, segundo valores de referência apresentados na Tabela

1, à contagem absoluta de linfócitos de cada animal estudado, verificou-se que, na primeira coleta de amostras sangüíneas, oito animais apresentavam linfocitose de tal monta. Destes animais, sete foram soropositivos na IDAG para LEB.

Com um intervalo de, no mínimo, 83 dias após a primeira coleta, foi realizado um segundo leucograma dos animais triados que apresentavam linfocitose acima de três DP. Nesta ocasião, verificou-se, entre as oito fêmeas apresentando aumento na contagem linfocitária com tal magnitude, que apenas aquelas que haviam sido soropositivas mantiveram esta contagem elevada, caracterizando-as como animais manifestando LP.

Destarte, entre as 99 fêmeas, 62 (62,63%) foram classificadas como pertencentes ao Grupo SN; 30 (30,30%), pertencendo ao Grupo AL; e 7 (7,07%), constituindo o Grupo LP (Figura 3).

Figura 3 – Distribuição de 99 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função dos resultados da imunodifusão em gel de agar (IDAG) para diagnóstico de leucose enzoótica bovina e do leucograma – São Paulo – 2007

Cinco animais pertencentes a cada grupo experimental foram selecionados, aleatoriamente, para a avaliação da produção intracelular de peróxido de hidrogênio por leucócitos circulantes.

Por ocasião desta segunda coleta de amostras sangüíneas, a média da idade destes animais foi de 46,07 ($\pm$ 10,10) meses, variando entre 32 e 62 meses. Esta média não diferiu entre os grupos avaliados, que foi de 44,60 ($\pm$ 12,26) meses, entre os animais pertencentes ao

Grupo SN, variando entre 32 e 59 meses; de 45,40 ($\pm 2,51$) meses, entre os animais pertencentes ao Grupo AL, variando entre 43 e 49 meses; e de 48,20 ($\pm 13,85$) meses, variando entre 32 e 62 meses, entre os animais pertencentes ao Grupo LP (Figura 4).

¹ AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente; SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina.

Figura 4 – Histograma da distribuição de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco em função da idade (meses), em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

5.1.1 Avaliação do hemograma dos animais selecionados

Os resultados dos hemogramas desta segunda coleta de amostras sanguíneas, nos 15 animais selecionados para a avaliação da produção intracelular de peróxido de hidrogênio por leucócitos circulantes, são apresentados na tabela 2 (resultados em números absolutos) e na tabela 3 (resultados da contagem diferencial relativa de leucócitos).

Tabela 2 – Resultados médios do hemograma, em números absolutos (média $\pm$ desvio padrão – DP) ¹ , de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental ² – São Paulo – 2007				
Parâmetros	Grupo experimental			p
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)	
	Média ($\pm$ DP)	Média ($\pm$ DP)	Média ($\pm$ DP)	
Eritrócitos ($\times 10^6$ /mL)	6,33 ($\pm 0,54$) ^a	5,26 ($\pm 0,66$) ^b	5,83 ($\pm 0,32$) ^{ab}	=0,024
Leucócitos/mL	10.360 (± 1.498) ^a	10.400 (± 1.378) ^a	33.300 (± 2.544) ^b	=0,009
Linfócitos/mL	5.686 (± 2.512) ^a	5.552 (± 2.146) ^a	26.335 (± 1.655) ^b	=0,009
Linfócitos pequenos/mL	4.855 (± 2.306) ^a	4.618 (± 1.569) ^a	17.283 (± 2.532) ^b	=0,009
Linfócitos grandes/mL	693 (± 685) ^a	893 (± 580) ^a	8.447 (± 1.220) ^b	=0,009
Linfócitos atípicos/mL	138 (± 104) ^a	41 (± 59) ^a	605 (± 297) ^b	=0,001
Neutrófilos/mL	3.082 (± 1.000) ^a	3.910 (± 923) ^a	5.595 (± 985) ^b	=0,014
Neutrófilos segmentados/mL	3.063 (± 1.000) ^a	3.910 (± 923) ^a	5.595 (± 985) ^b	=0,012
Neutrófilos bastonetes/mL	19 (± 43)	0	0	
Eosinófilos/mL	1.452 (± 1.066)	672 (± 247)	1.240 (± 952)	
Monócitos/mL	93 (± 91)	41 (± 59)	526 (± 439)	
Basófilos/mL	74 (± 70)	71 (± 107)	0	

¹ Valores com letras diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na última coluna. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente.

Tabela 3 – Resultados médios da contagem diferencial relativa de leucócitos sanguíneos (%)¹, de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental² – São Paulo – 2007

Parâmetros	Grupo experimental			p
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)	
	Média (± DP)	Média (± DP)	Média (± DP)	
Linfócitos	53,60 (± 5,41) ^a	54,40 (± 7,60) ^a	79,20 (± 3,19) ^b	<0,001
Linfócitos pequenos	44,80 (± 7,19)	45,80 (± 4,49)	51,80 (± 5,07)	
Linfócitos grandes	7,40 (± 4,51) ^a	8,20 (± 3,77) ^a	25,60 (± 4,77) ^b	<0,001
Linfócitos atípicos	1,40 (± 0,89) ^{ab}	0,40 (± 0,55) ^a	1,80 (± 0,84) ^b	=0,038
Neutrófilos	30,00 (± 9,41) ^a	37,80 (± 8,17) ^a	15,60 (± 2,88) ^b	=0,008
Neutrófilos segmentados	29,80 (± 9,36) ^a	37,80 (± 8,17) ^b	15,60 (± 2,88) ^c	=0,008
Neutrófilos bastonetes	0,20 (± 0,45)	0	0	
Eosinófilos	14,40 (± 7,57) ^a	6,80 (± 2,49) ^{ab}	3,60 (± 2,61) ^b	=0,012
Monócitos	1,40 (± 1,67)	0,40 (± 0,55)	1,60 (± 1,34)	
Basófilos	0,60 (± 0,55)	0,60 (± 0,89)	0	

¹ Valores com letras diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na última coluna. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente.

A contagem eritrocitária dos animais pertencentes ao Grupo SN (Tabela 2) foi maior (p=0,024) que aquela verificada nos animais pertencente ao Grupo AL. Entretanto, ambas não diferiram da média observada nos animais pertencentes ao Grupo LP (Figura 5).

Na tabela 2, verifica-se que a média da quantidade de leucócitos dos animais do Grupo SN não foi diferente daquela encontrada nos animais do Grupo AL. Entretanto, ambas foram menores (p=0,009) do que aquela observada no grupo LP (Figura 6).

¹ AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente; SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina.

Figura 5 – Histograma da contagem de eritrócitos (células $\times 10^6$ /mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

¹ AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente; SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina.

Figura 6 – Histograma da contagem total de leucócitos (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

Também, a média da contagem diferencial absoluta de linfócitos (Tabela 2) entre os animais do Grupo SN não diferiu da média dos animais do Grupo AL. Todavia, ambas foram menores ($p=0,009$) do que a média observada nos animais do Grupo LP (Figura 7).

¹ AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente; SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina.

Figura 7 – Histograma da contagem absoluta de linfócitos totais (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

Pode-se observar, na tabela 3, que, à contagem diferencial relativa de leucócitos, a porcentagem média de linfócitos verificada nas fêmeas pertencentes ao Grupo SN não diferiu da média observada nas fêmeas do Grupo AL. Contudo, ambas foram menores ($p<0,001$) do que a média observada nos animais pertencentes ao Grupo LP.

Não houve diferença na porcentagem média de linfócitos pequenos entre os grupos experimentais (Tabela 3). Já a média da contagem diferencial absoluta de linfócitos pequenos (Tabela 2) entre os animais pertencentes ao Grupo SN não diferiu da verificada entre os animais pertencentes ao Grupo AL. Porém, ambas foram menores ($p=0,009$) que a média observada entre os animais pertencentes ao Grupo LP (Figura 8).

¹ AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente; SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina.

Figura 8 – Histograma da contagem absoluta de linfócitos pequenos (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

A média da contagem diferencial absoluta de linfócitos grandes, entre os animais pertencentes ao Grupo SN (Tabela 2), não diferiu daquela observada entre os animais pertencentes ao Grupo AL. Porém, ambas foram menores ($p=0,009$) do que a média da contagem diferencial absoluta de linfócitos grandes verificada entre os animais pertencentes ao Grupo LP (Figura 9). Já, entre as fêmeas do Grupo SN, a porcentagem média de linfócitos grandes (Tabela 3) não diferiu da média verificada entre as fêmeas do Grupo AL. Todavia, ambas foram menores ($p<0,001$) que aquela observada entre as fêmeas do Grupo LP.

¹ AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente; SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina.

Figura 9 – Histograma da contagem absoluta de linfócitos grandes (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

A média da contagem diferencial absoluta de linfócitos atípicos (Tabela 2) entre os animais do Grupo SN não diferiu daquela observada nos animais do Grupo AL. Contudo, ambas foram menores ($p=0,001$) do que aquela observada entre os animais do Grupo LP (Figura 10).

Já, entre as fêmeas pertencentes ao Grupo SN, a porcentagem média de linfócitos atípicos (Tabela 3) não diferiu da média verificada nos demais grupos. Já entre as fêmeas do Grupo AL, a média de linfócitos atípicos foi menor ($p=0,038$) que aquela verificada entre os animais pertencentes ao Grupo LP.

AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente; SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina.

Figura 10 – Histograma da contagem absoluta de linfócitos atípicos (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

Na tabela 2, verifica-se que a média da contagem diferencial absoluta de neutrófilos verificada nos animais pertencentes ao Grupo SN não diferiu daquela verificada entre os animais do Grupo AL. Todavia, ambas foram menores ($p=0,014$) que aquela observada entre os animais do Grupo LP (Figura 11).

E, na tabela 3, observa-se que a média da porcentagem de neutrófilos dos animais pertencentes ao Grupo SN não diferiu daquela observada nos animais do Grupo AL. Contudo, ambas foram maiores ($p=0,008$) que a média observada nos animais do Grupo LP.

¹ AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente; SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina.

Figura 11 – Histograma da contagem absoluta de neutrófilos totais (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

Entre os animais pertencentes ao Grupo SN (Tabela 2), a média da contagem diferencial absoluta de neutrófilos segmentados não diferiu da média verificada nos animais pertencentes ao Grupo AL. Porém, ambas foram menores ($p=0,012$) que a média observada entre os animais do Grupo LP (Figura 12).

Contudo, nos animais do Grupo SN (Tabela 3), a porcentagem média de neutrófilos segmentados observada foi menor ($p=0,008$) que aquela observada entre os animais do Grupo AL. Ambas foram maiores ($p=0,008$) que aquela verificada entre os animais do Grupo LP.

¹ AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente; SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina.

Figura 12 – Histograma da contagem absoluta de neutrófilos segmentados (células/mL de sangue) realizada em 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

Apenas em um animal do Grupo SN foi observado 97 (1%) neutrófilos bastonetes (Tabelas 2 e 3).

A contagem diferencial absoluta de eosinófilos não diferiu entre os grupos experimentais (Tabela 2). Outrossim, a porcentagem média de eosinófilos (Tabela 3), para as fêmeas do Grupo SN não diferiu da observada no Grupo AL. Todavia, ela foi maior ($p=0,012$) do que a média verificada no Grupo LP.

Não houve, também, diferença entre as porcentagens médias e as contagens absolutas de monócitos e de basófilos verificadas entre os grupos (Tabelas 6 e 7).

5.2 ENSAIOS DE PRODUÇÃO INTRACELULAR DE H_2O_2 E DE FAGOCITOSE

Os leucócitos sangüíneos obtidos das amostras das quinze fêmeas selecionadas foram submetidos a ensaios de produção intracelular de H_2O_2 , por citometria de fluxo, frente diferentes estímulos celulares *in vitro*.

A avaliação da produção intracelular de H_2O_2 com estímulo por meio da fagocitose *in vitro* de SaPI permitiu, também, a análise da intensidade da fagocitose, por citometria de fluxo, através da mensuração da intensidade da fluorescência do iodeto de propídio. Desta forma, pôde-se, ainda, avaliar a produção celular de H_2O_2 em função da realização da fagocitose.

5.2.1 Ensaios de produção intracelular de H_2O_2

Os ensaios de produção intracelular de H_2O_2 de leucócitos obtidos das amostras sanguíneas dos 15 animais selecionados, por citometria de fluxo, permitiram a avaliação do comportamento das células frente aos diferentes estímulos *in vitro*.

Para se avaliar a produção de H_2O_2 , uma alíquota da amostra coletada de cada animal foi preparada para o ensaio, por citometria, sem prévio estímulo. Outras três alíquotas receberam estímulo por adição *in vitro* de PMA, de LPS, ou através da fagocitose *in vitro* de SaPI.

5.2.1.1 Porcentagem de leucócitos produzindo H_2O_2 frente a diferentes estímulos *in vitro*

Na Tabela 4 estão agrupados os dados referentes à porcentagem média de células produzindo H_2O_2 frente os estímulos *in vitro*.

Foi possível verificar (Tabela 4) que a porcentagem média total de células produzindo H_2O_2 no ensaio sem estímulo *in vitro* foi menor ($p=0,005$) que aquela observada no ensaio com adição *in vitro* de LPS e que aquela obtida no ensaio com adição *in vitro* de PMA. A porcentagem média total de células produzindo H_2O_2 no ensaio com estímulo por fagocitose *in vitro* de SaPI não diferiu da observada no ensaio sem estímulo. Do mesmo modo, as porcentagens médias totais de células produzindo H_2O_2 não diferiram entre os demais ensaios (Figura 13).

Tabela 4 – Porcentagens (média $\pm$ desvio padrão)¹ de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, produzindo peróxido de hidrogênio intracelular frente diferentes estímulos *in vitro*, verificadas por citometria de fluxo, separados em função do grupo experimental² – São Paulo – 2007

Estímulo ³	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Sem estímulo	33,00 ($\pm 19,66$) ^{Aa}	18,80 ($\pm 16,68$) ^{Aa}	40,00 ($\pm 8,60$) ^{Aa}	>0,05	30,60 ($\pm 17,16$) ^A
Adição <i>in vitro</i> de PMA	62,80 ($\pm 34,50$) ^{Ba}	58,00 ($\pm 43,80$) ^{Ba}	68,60 ($\pm 9,56$) ^{Ba}	>0,05	63,13 ($\pm 30,60$) ^B
Adição <i>in vitro</i> de LPS	57,20 ($\pm 10,47$) ^{Ba}	46,60 ($\pm 23,00$) ^{Ba}	52,20 ($\pm 14,72$) ^{ABa}	>0,05	52,00 ($\pm 16,25$) ^B
Fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI	56,40 ($\pm 25,30$) ^{Ba}	42,60 ($\pm 28,40$) ^{Ba}	43,40 ($\pm 5,77$) ^{Aa}	>0,05	47,47 ($\pm 21,58$) ^{AB}
p	=0,008	=0,001	=0,018		=0,005

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ³ PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio.

¹ SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ² PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo experimental, diferença com $p \leq 0,05$.

Figura 13 – Porcentagem de leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes estímulos *in vitro*, realizada em amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo

experimental – São Paulo – 2007

Tal comportamento foi semelhante quando avaliadas apenas as amostras sangüíneas obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN (Tabela 4), em que a porcentagem média de células produzindo H_2O_2 no ensaio sem estímulo *in vitro*, foi menor ($p=0,008$) que aquela observada nos demais ensaios. Do mesmo modo, quando analisadas apenas as amostras sangüíneas obtidas de animais pertencentes ao Grupo AL, a porcentagem média de células produzindo H_2O_2 no ensaio sem estímulo *in vitro* foi menor ($p=0,001$) que aquela observada nos demais ensaios (Figura 13).

No entanto, observa-se, também, na tabela 4 que, quando analisadas apenas as amostras sangüíneas obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP, a porcentagem média de células produzindo H_2O_2 no ensaio com adição *in vitro* de PMA foi maior ($p=0,018$) que aquela observada no ensaio sem estímulo *in vitro* e que aquela obtida no ensaio com estímulo por fagocitose *in vitro* de SaPI. As porcentagens médias de células produzindo peróxido de hidrogênio não diferiram, neste grupo entre os demais ensaios (Figura 13).

Verificou-se, entretanto, que a porcentagem de células produzindo H_2O_2 não diferiu entre os grupos experimentais, tanto no ensaio sem estímulo prévio, quanto nos demais ensaios, em que houve estímulo *in vitro* (Figura 14).

¹ PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ² SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Valores com letras diferentes em um mesmo ensaio, diferença com $p \leq 0,001$.

Figura 14 – Porcentagem de leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes ensaios, realizada em amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

5.2.1.2 Tamanho das células produzindo H_2O_2

Na tabela 5 estão compilados os dados referentes ao tamanho médio (em unidades arbitrárias) de células produzindo H_2O_2 , frente aos diferentes estímulos *in vitro*. Nas figuras 41 a 52, podem ser observados citogramas de leucócitos obtidos de animais pertencentes aos três grupos experimentais, segundo o ensaio de produção de H_2O_2 . Neles, cada ponto representa uma célula caracterizada em função de seu tamanho (FSC) e sua complexidade (SSC).

Observa-se que, avaliando-se os resultados obtidos em todas as amostras sanguíneas (Tabela 5), o tamanho médio das células que estavam produzindo H_2O_2 não diferiu em relação aos quatro ensaios (Figura 15).

Tabela 5 – Valores de FSC (média $\pm$ desvio padrão)¹ de leucócitos que estavam produzindo peróxido de hidrogênio intracelular frente diferentes estímulos *in vitro*, obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separados em função do grupo experimental² – São Paulo – 2007

Estímulo ³	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Sem estímulo	189,20 ($\pm$ 6,00) ^{Aa}	264,12 ($\pm$ 69,87) ^{Ab}	185,87 ($\pm$ 10,07) ^{Aa}	=0,017	213,10 ($\pm$ 19,66) ^A
Adição <i>in vitro</i> de PMA	274,01 ($\pm$ 22,42) ^{Ba}	299,27 ($\pm$ 44,07) ^{Aa}	189,88 ($\pm$ 12,84) ^{Ab}	<0,001	254,40 ($\pm$ 55,60) ^A
Adição <i>in vitro</i> de LPS	196,61 ($\pm$ 10,27) ^{Aa}	239,00 ($\pm$ 64,86) ^{Aa}	186,57 ($\pm$ 6,53) ^{Aa}	>0,05	207,40 ($\pm$ 42,40) ^A
Fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI	199,41 ($\pm$ 13,36) ^{Aa}	246,62 ($\pm$ 52,41) ^{Aa}	206,47 ($\pm$ 15,84) ^{Aa}	>0,05	217,50 ($\pm$ 37,02) ^A
p	<0,001	>0,05	>0,05		

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ³ PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio.

¹ SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ² PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo experimental, diferença com $p \leq 0,001$.

Figura 15 – Tamanho médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes estímulos *in vitro*, em amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

Contudo, observando-se apenas as amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN (Figura 15), notou-se que o tamanho médio das células que estavam produzindo H_2O_2 no ensaio com estímulo *in vitro* com PMA foi maior ($p<0,001$) que aquele observado nas células que estavam produzindo peróxido de hidrogênio nos demais ensaios (Tabela 5).

Ainda, na figura 15 e na tabela 5, verifica-se que, analisando-se apenas os leucócitos obtidos de animais pertencentes ao Grupo AL ou ao Grupo LP, não foi verificada diferença no tamanho médio das células que estavam produzindo peróxido de hidrogênio, frente aos diferentes estímulos.

Não obstante, observa-se, também, na tabela 5, que o tamanho médio dos leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 sem estímulo *in vitro*, nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo AL, foi maior ($p=0,017$) que o verificado nas células das amostras de animais pertencentes ao Grupo LP e pertencentes ao Grupo SN (Figura 16).

¹ PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ² SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo experimental, diferença com $p \leq 0,05$.

Figura 16 – Tamanho médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes ensaios, realizada em amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

Além disso, observou-se que o tamanho médio dos leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 após estímulo *in vitro* com PMA, nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP, foi menor ($p < 0,001$) que o verificado nas células das amostras de animais pertencentes ao Grupo AL e pertencentes ao Grupo SN (Figura 16).

Verifica-se, também, na tabela 5, que, após estímulo com a adição *in vitro* de LPS ou após fagocitose *in vitro* de SaPI, o tamanho médio dos leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 , não diferiu em relação ao grupo experimental (Figura 16).

5.2.1.3 Tamanho das células que não estavam produzindo H_2O_2

Na tabela 6 estão compilados os dados referentes ao tamanho médio (em unidades arbitrárias) de células que não estavam produzindo H_2O_2 , nos ensaios, frente aos diferentes estímulos *in vitro*.

Tabela 6 – Valores de FSC (média $\pm$ desvio padrão)¹ de leucócitos que não estavam produzindo peróxido de hidrogênio intracelular frente diferentes estímulos *in vitro*, obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separados em função do grupo experimental² – São Paulo – 2007

Estímulo ³	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Sem estímulo	169,50 ($\pm 29,70$) ^{Aa}	178,40 ($\pm 41,70$) ^{Aa}	142,61 ($\pm 11,18$) ^{Aa}	>0,05	163,52 ($\pm 16,68$) ^A
Adição <i>in vitro</i> de PMA	152,16 ($\pm 40,79$) ^{Aa}	173,70 ($\pm 33,47$) ^{Aa}	134,80 ($\pm 10,87$) ^{Aa}	>0,05	153,34 ($\pm 33,04$) ^A
Adição <i>in vitro</i> de LPS	165,69 ($\pm 21,29$) ^{Aab}	182,36 ($\pm 22,61$) ^{Aa}	145,20 ($\pm 10,97$) ^{Ab}	=0,030	164,41 ($\pm 23,61$) ^A
Fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI	181,34 ($\pm 37,69$) ^{Aa}	177,71 ($\pm 21,09$) ^{Aa}	152,68 ($\pm 10,12$) ^{Aa}	>0,05	170,58 ($\pm 27,13$) ^A
p	>0,05	>0,05	>0,05		

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ³ PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio.

Avaliando-se os resultados obtidos em todas as amostras sanguíneas, o tamanho médio das células que não estavam produzindo H_2O_2 não diferiu em relação aos quatro ensaios

(Tabela 10). Do mesmo modo, analisando-se apenas os leucócitos obtidos de animais pertencentes ao mesmo grupo experimental, não foi verificada diferença no tamanho médio das células que não estavam produzindo H_2O_2 , frente aos diferentes estímulos (Figura 17).

¹ SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ² PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo experimental, diferença com $p \leq 0,001$.

Figura 17 – Tamanho médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) que não estavam produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes estímulos *in vitro*, em amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

Entretanto, verifica-se na tabela 6 que, no ensaio com adição *in vitro* de LPS, o tamanho médio dos leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 , nas amostras obtidas dos animais pertencentes ao Grupo LP, foi menor ($p=0,030$) que aquele das amostras obtidas dos animais pertencentes ao Grupo AL. Ambos não diferiram do tamanho médio dos leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 , nas amostras obtidas dos animais pertencentes ao Grupo SN (Figura 18).

¹ PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ² SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo experimental, diferença com $p \leq 0,05$.

Figura 18 – Tamanho médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) que não estavam produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes ensaios, realizados em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

Não foi observada diferença no tamanho das células, entre os grupos experimentais, nos demais ensaios (Figura 18 e Tabela 6).

5.2.1.4 Comparação do tamanho das células frente à produção de H_2O_2

Pela tabela 7, verifica-se que, à citometria de fluxo, os leucócitos produzindo H_2O_2 sem estímulo *in vitro* obtiveram, avaliando-se todas as 15 amostras, tamanho médio maior ($p=0,002$) que o tamanho médio das células que não estavam produzindo H_2O_2 .

Entretanto, verifica-se na tabela 7 que, avaliando-se as amostras sangüíneas dentro de cada grupo experimental, tal diferença manteve-se apenas nas amostras pertencentes aos animais do Grupo LP. Neste grupo, os leucócitos produzindo H_2O_2 sem estímulo *in vitro* obtiveram tamanho médio maior ($p<0,001$) que o tamanho médio dos leucócitos que não

estavam produzindo H_2O_2 .

Tabela 7 – Comparação entre o FSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários) ¹ , em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sem estímulo <i>in vitro</i> , de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental ² – São Paulo – 2007					
H_2O_2	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Produzindo	189,20 ($\pm 6,00$) ^{Aa}	264,12 ($\pm 69,87$) ^{Ab}	185,87 ($\pm 10,07$) ^{Aa}	=0,017	213,10 ($\pm 19,66$) ^A
Não produzindo	169,50 ($\pm 29,70$) ^{Aa}	178,40 ($\pm 41,70$) ^{Aa}	142,61 ($\pm 11,18$) ^{Ba}	>0,05	163,52 ($\pm 16,68$) ^B
p	>0,05	>0,05	<0,001		=0,002

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente.

Também, pela tabela 8, observa-se que os leucócitos produzindo H_2O_2 após estímulo *in vitro* com PMA alcançaram, avaliando-se todas as 15 amostras, tamanho médio maior ($p < 0,001$) que o tamanho médio das células que não estavam produzindo H_2O_2 .

Tabela 8 – Comparação entre o FSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários) ¹ , em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após estímulo <i>in vitro</i> com a adição de PMA ² , de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental ³ – São Paulo – 2007					
H_2O_2	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Produzindo	274,01 ($\pm 22,42$) ^{Aa}	299,27 ($\pm 44,07$) ^{Aa}	189,88 ($\pm 12,84$) ^{Ab}	<0,001	254,40 ($\pm 55,60$) ^A
Não produzindo	152,16 ($\pm 40,79$) ^{Ba}	173,70 ($\pm 33,47$) ^{Ba}	134,80 ($\pm 10,87$) ^{Ba}	>0,05	153,34 ($\pm 33,04$) ^B
p	=0,006	=0,005	=0,005		<0,001

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol. ³ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente.

Avaliando-se as amostras sanguíneas dentro de cada grupo experimental, verifica-se, na tabela 8, que, após estímulo *in vitro* com PMA, tal diferença também se manteve. Nas

amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN, os leucócitos produzindo H_2O_2 , obtiveram tamanho médio maior ($p=0,006$) que o tamanho médio dos leucócitos que não estavam produzindo. Nas amostras obtidas de animais do Grupo AL, o tamanho médio dos leucócitos produzindo H_2O_2 foi maior ($p=0,005$) que o tamanho médio dos leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 . E, entre as amostras obtidas de animais do Grupo LP, o tamanho médio dos leucócitos produzindo H_2O_2 também foi maior ($p=0,005$) que o tamanho médio das células que não estavam produzindo.

Na tabela 9, observa-se que os leucócitos produzindo H_2O_2 após estímulo *in vitro* com LPS alcançaram, avaliando-se todas as 15 amostras, tamanho médio maior ($p=0,001$) que o tamanho médio das células que não estavam produzindo.

Tabela 9 – Comparação entre o FSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários) ¹ , em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após estímulo <i>in vitro</i> com a adição de LPS ² , de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental ³ – São Paulo – 2007					
H_2O_2	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Produzindo	196,61 ($\pm 10,27$) ^{Aa}	239,00 ($\pm 64,86$) ^{Aa}	186,57 ($\pm 6,53$) ^{Aa}	>0,05	207,40 ($\pm 42,40$) ^A
Não produzindo	165,69 ($\pm 21,29$) ^{Bab}	182,36 ($\pm 22,61$) ^{Aa}	145,20 ($\pm 10,97$) ^{Bb}	=0,030	164,41 ($\pm 23,61$) ^B
p	=0,025	>0,05	<0,001		=0,001

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*. ³ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente.

Avaliando-se as amostras sanguíneas dentro de cada grupo experimental, verifica-se que, após estímulo *in vitro* com LPS, esta diferença manteve-se apenas entre os leucócitos obtidos de animais pertencentes ao Grupo SN e ao Grupo LP (Tabela 9). Nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN, os leucócitos produzindo H_2O_2 alcançaram tamanho médio maior ($p=0,025$) que o tamanho médio dos leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 .

Verifica-se, também, na tabela 9 que, nas amostras obtidas de animais do Grupo LP, o tamanho médio dos leucócitos produzindo H_2O_2 após estímulo *in vitro* com LPS foi maior ($p<0,001$) que o tamanho médio dos leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 .

Pela tabela 10, nota-se que os leucócitos produzindo H_2O_2 após estímulo *in vitro* com

fagocitose de SaPI alcançaram, avaliando-se todas as 15 amostras, tamanho médio maior ($p=0,001$) que o tamanho médio das células que não estavam produzindo H_2O_2 .

Tabela 10 – Comparação entre o FSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários)¹, em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após estímulo com fagocitose *in vitro* de SaPI², de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental³ – São Paulo – 2007

H_2O_2	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Produzindo	199,41 ($\pm 13,36$) ^{Aa}	246,62 ($\pm 52,41$) ^{Aa}	206,47 ($\pm 15,84$) ^{Aa}	>0,05	217,50 ($\pm 37,02$) ^A
Não produzindo	181,34 ($\pm 37,69$) ^{Aa}	177,71 ($\pm 21,09$) ^{Ba}	152,68 ($\pm 10,12$) ^{Ba}	>0,05	170,58 ($\pm 27,13$) ^B
p	>0,05	=0,045	<0,001		=0,001

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ³ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente.

Avaliando-se as amostras sanguíneas dentro de cada grupo experimental, verifica-se que esta diferença não se manteve entre os leucócitos obtidos de animais pertencentes ao Grupo SN (Tabela 10). No entanto, nas amostras obtidas de animais do Grupo AL, o tamanho médio dos leucócitos produzindo H_2O_2 após estímulo *in vitro* com fagocitose de SaPI, também foi maior ($p=0,045$) que o tamanho médio dos leucócitos que não estavam produzindo.

Além disso, entre as amostras obtidas de animais do Grupo LP, o tamanho médio dos leucócitos produzindo H_2O_2 foi, também, maior ($p<0,001$) que o tamanho médio das células que não estavam produzindo H_2O_2 (Tabela 10).

5.2.1.5 Complexidade das células produzindo H_2O_2

Na tabela 11 estão compilados os dados referentes à complexidade média (em valores arbitrários), obtida por citometria de fluxo, das células produzindo H_2O_2 , frente aos diferentes estímulos *in vitro*.

Tabela 11 – Valores de SSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários)¹ de leucócitos que estavam produzindo peróxido de hidrogênio intracelular frente diferentes estímulos *in vitro*, obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separados em função do grupo experimental² – São Paulo – 2007

Estímulo ³	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Sem estímulo	241,00 ($\pm$ 30,80) ^{Aa}	175,90 ($\pm$ 42,10) ^{Ab}	135,46 ($\pm$ 18,05) ^{Ab}	=0,001	184,10 ($\pm$ 53,80) ^A
Adição <i>in vitro</i> de PMA	178,93 ($\pm$ 26,03) ^{Ba}	146,68 ($\pm$ 87,23) ^{Aab}	78,02 ($\pm$ 8,74) ^{Bb}	=0,030	134,50 ($\pm$ 65,50) ^A
Adição <i>in vitro</i> de LPS	202,10 ($\pm$ 23,94) ^{ABa}	150,75 ($\pm$ 40,27) ^{Aab}	118,32 ($\pm$ 10,14) ^{Ab}	=0,005	157,10 ($\pm$ 46,50) ^A
Fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI	222,67 ($\pm$ 11,29) ^{Aa}	179,62 ($\pm$ 46,55) ^{Aab}	140,79 ($\pm$ 16,83) ^{Ab}	=0,003	181,03 ($\pm$ 43,98) ^A
p	=0,006	>0,05	<0,001		

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ³ PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio.

Pela tabela 11, nota-se que, avaliando-se os resultados obtidos em todas as amostras sanguíneas, a complexidade média das células que estavam produzindo H₂O₂ não diferiu em relação aos quatro ensaios (Figura 19).

Contudo, verificando-se apenas as amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN (Tabela 11), notou-se que a complexidade média das células que estavam produzindo H₂O₂ no ensaio com estímulo *in vitro* com PMA, foi menor (p=0,006) que aquela verificada nas células que estavam produzindo H₂O₂ tanto no ensaio com estímulo por fagocitose, quanto no ensaio em que não houve estímulo *in vitro* (Figura 19).

¹ SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ² PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo experimental, diferença com $p \leq 0,05$.

Figura 19 – Valores de SSC médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes estímulos *in vitro*, em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

Analisando-se apenas os leucócitos obtidos de animais pertencentes ao Grupo AL, não foi verificada diferença na complexidade média de células que estavam produzindo H_2O_2 , frente aos diferentes estímulos. Contudo, avaliando-se apenas as amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP, notou-se que a complexidade média das células que estavam produzindo H_2O_2 no ensaio com estímulo *in vitro* com PMA foi menor ($p < 0,001$) que aquela verificada nas células que estavam produzindo H_2O_2 nos demais ensaios (Tabela 11 e Figura 19).

Além disso, verifica-se, na tabela 11, que a complexidade média dos leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 sem estímulo *in vitro*, nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN, foi maior ($p = 0,001$) que a verificada tanto nas células das amostras de animais pertencentes ao Grupo LP, quanto naquelas pertencentes ao Grupo AL (Figura 20).

¹ PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ² SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo experimental, diferença com $p \leq 0,05$.

Figura 20 – Valores de SSC médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) produzindo peróxido de hidrogênio, frente diferentes ensaios, realizada em amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

Já após estímulo *in vitro* com adição de PMA, a complexidade média dos leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN, foi maior ($p=0,030$) que a verificada nas células das amostras de animais pertencentes ao Grupo LP (Figura 20). A complexidade média das células que estavam produzindo H_2O_2 , nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo AL não diferiu da complexidade média das células do Grupo SN ou do Grupo LP (Tabela 11).

Após estímulo *in vitro* com adição de LPS, também se verificou que a complexidade média dos leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN, foi maior ($p=0,005$) que a verificada nas células das amostras de animais pertencentes ao Grupo LP. Neste ensaio, a complexidade média das células que estavam produzindo H_2O_2 , nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo AL também não diferiu da complexidade média das células do Grupo SN ou do Grupo LP (Tabela 11 e Figura 20).

E a complexidade média dos leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 após fagocitose

in vitro de SaPI, nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN, foi maior ($p=0,003$) que a verificada nas células das amostras de animais pertencentes ao Grupo LP. Também neste ensaio, a complexidade média das células que estavam produzindo H_2O_2 , nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo AL não diferiu da complexidade média das células do Grupo SN ou do Grupo LP (Tabela 11 e Figura 20).

5.2.1.6 Complexidade das células que não estavam produzindo H_2O_2

Na tabela 12 estão compilados os dados referentes à complexidade média das células (em valores arbitrários), obtida por citometria de fluxo, que não produziam H_2O_2 , frente aos diferentes estímulos *in vitro*.

Tabela 12 – Valores de SSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários)¹ de leucócitos que não produziam peróxido de hidrogênio intracelular frente diferentes estímulos *in vitro*, obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separados em função do grupo experimental² – São Paulo – 2007

Estímulo ³	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Sem estímulo	86,19 ($\pm 15,77$) ^{ABa}	90,55 ($\pm 13,92$) ^{ABa}	68,06 ($\pm 9,61$) ^{Ab}	=0,047	81,60 ($\pm 15,95$) ^{AB}
Adição <i>in vitro</i> de PMA	73,78 ($\pm 6,40$) ^{Aa}	80,31 ($\pm 7,12$) ^{Aa}	46,99 ($\pm 7,15$) ^{Bb}	<0,001	63,03 ($\pm 16,23$) ^A
Adição <i>in vitro</i> de LPS	75,98 ($\pm 5,53$) ^{Aab}	84,98 ($\pm 9,67$) ^{Aa}	64,57 ($\pm 6,89$) ^{Ab}	<0,001	75,18 ($\pm 11,12$) ^A
Fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI	99,76 ($\pm 13,57$) ^{Ba}	110,65 ($\pm 21,20$) ^{Ba}	72,69 ($\pm 4,92$) ^{Ab}	=0,005	94,37 ($\pm 21,47$) ^B
p	=0,008	=0,018	<0,001		<0,001

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ³ PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio.

Verificou-se, quando avaliada a complexidade média de todas as células que não estavam produzindo H_2O_2 , que, no ensaio com estímulo através da fagocitose *in vitro* de SaPI, sua complexidade média foi maior ($p<0,001$) que aquela observada nas células que não estavam produzindo H_2O_2 nos ensaios com estímulo por adição *in vitro* de PMA ou de LPS

(Tabela 12 e Figura 21).

¹ SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ² PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo experimental, diferença com $p \leq 0,05$.

Figura 21 – Valores de SSC médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) que não produziam peróxido de hidrogênio, frente diferentes estímulos *in vitro*, em amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

Contudo, verificando-se apenas as amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN, notou-se que a granulosidade média de células que não estavam produzindo H_2O_2 , após estímulo com fagocitose, foi maior ($p=0,008$) que aquela verificada nos leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 , após estímulo com LPS e com PMA. Já, analisando-se apenas os leucócitos obtidos de animais pertencentes ao Grupo AL, a complexidade média das células que não estavam produzindo H_2O_2 , neste ensaio, foi maior ($p=0,018$) que aquela observada nas células que não estavam produzindo H_2O_2 nos ensaios com estímulo por adição *in vitro* de PMA e por adição *in vitro* de LPS.

Ainda, avaliando-se apenas as amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP, notou-se que a complexidade média de células que não estavam produzindo H_2O_2 , neste ensaio com estímulo *in vitro* com PMA, foi menor ($p<0,001$) que aquela observada nas células que não estavam produzindo H_2O_2 nos demais ensaios (Tabela 12 e Figura 21).

Ao se comparar os leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 sem estímulo *in vitro* (Tabela 12), verificou-se que a complexidade média das células obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP foi menor ($p=0,047$) que a observada nos leucócitos obtidos de animais pertencentes ao Grupo AL e ao Grupo SN (Figura 22).

¹ PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ² SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo experimental, diferença com $p \leq 0,05$.

Figura 22 – Valores de SSC médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) que não produziam peróxido de hidrogênio, frente diferentes ensaios, realizada em amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

Tal comportamento repetiu-se nos ensaios após estímulo *in vitro* com PMA ($p < 0,001$) e após fagocitose *in vitro* de SaPI ($p = 0,005$) (Tabela 12 e Figura 22).

Já, comparando-se os leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 , após estímulo *in vitro* com LPS, verificou-se que a complexidade média das células obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP foi menor ($p < 0,001$) que a observada nos leucócitos obtidos de animais pertencentes ao Grupo AL. Contudo, a complexidade média das células que não estavam produzindo H_2O_2 , nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN não diferiu da complexidade média das células do Grupo AL ou do Grupo LP (Tabela 12 e Figura 22).

5.2.1.7 Comparação da complexidade celular frente à produção de H₂O₂

Avaliando-se todas as 15 amostras, foi verificado, entre as células produzindo H₂O₂ sem estímulo *in vitro* (Tabela 13), complexidade média maior ($p < 0,001$) que a complexidade média das células que não estavam produzindo H₂O₂.

Tabela 13 – Comparação entre o SSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários)¹, em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sem estímulo *in vitro*, de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental² – São Paulo – 2007

H ₂ O ₂	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Produzindo	241,00 ($\pm 30,80$) ^{Aa}	175,90 ($\pm 42,10$) ^{Ab}	135,46 ($\pm 18,05$) ^{Ab}	=0,001	184,10 ($\pm 53,80$) ^A
Não produzindo	86,19 ($\pm 15,77$) ^{Ba}	90,55 ($\pm 13,92$) ^{Ba}	68,06 ($\pm 9,61$) ^{Bb}	=0,047	81,06 ($\pm 15,95$) ^B
p	<0,001	=0,008	<0,001		<0,001

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente.

Observa-se pela tabela 13 que esta diferença manteve-se nos três grupos, quando foram avaliadas as amostras sanguíneas dentro do Grupo SN ($p < 0,001$), do Grupo AL ($p = 0,008$) e do Grupo LP ($p < 0,001$).

Avaliando-se todas as 15 amostras, foi verificada, entre as células produzindo H₂O₂ também após estímulo *in vitro* com adição de PMA (Tabela 14), complexidade média maior ($p = 0,001$) que a complexidade média das células que não estavam produzindo H₂O₂.

Tabela 14 – Comparação entre o SSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários)¹, em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após estímulo *in vitro* com a adição de PMA², de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental³ – São Paulo – 2007

H_2O_2	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Produzindo	178,93 ($\pm 26,03$) ^{Aa}	146,68 ($\pm 87,23$) ^{Aab}	78,02 ($\pm 8,74$) ^{Ab}	=0,030	134,50 ($\pm 65,50$) ^A
Não produzindo	73,78 ($\pm 6,40$) ^{Ba}	80,31 ($\pm 7,12$) ^{Aa}	46,99 ($\pm 7,15$) ^{Bb}	<0,001	67,03 ($\pm 16,23$) ^B
p	=0,001	>0,05	=0,006		=0,001

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol. ³ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente.

Observa-se pela tabela 14 que esta diferença manteve-se, apenas, nos grupos LP e SN, quando foram avaliadas as amostras sangüíneas dentro de cada grupo experimental. Após estímulo *in vitro* com a adição de PMA, no Grupo SN, verificou-se complexidade média nos leucócitos produzindo H_2O_2 maior ($p=0,001$) que a complexidade média dos leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 .

E, nas amostras obtidas de animais do Grupo LP, a complexidade média dos leucócitos produzindo H_2O_2 foi maior ($p=0,006$) que a complexidade média dos leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 (Tabela 14).

Após estímulo *in vitro* com adição de LPS (Tabela 15), avaliando-se todas as 15 amostras, também foi verificado, entre as células produzindo H_2O_2 complexidade média maior ($p<0,001$) que a complexidade média das células que não estavam produzindo H_2O_2 .

Tabela 15 – Comparação entre o SSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários)¹, em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) após estímulo *in vitro* com a adição de LPS², de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental³ – São Paulo – 2007

H ₂ O ₂	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Produzindo	202,10 ($\pm$ 23,94) ^{Aa}	150,75 ($\pm$ 40,27) ^{Aab}	118,32 ($\pm$ 10,14) ^{Ab}	=0,009	157,10 ($\pm$ 46,50) ^A
Não produzindo	75,98 ($\pm$ 5,53) ^{Bab}	84,98 ($\pm$ 9,67) ^{Ba}	64,57 ($\pm$ 6,89) ^{Bb}	<0,001	75,18 ($\pm$ 11,12) ^B
p	<0,001	=0,041	=0,001		<0,001

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*. ³ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente.

Verifica-se, na tabela 15, que esta diferença manteve-se quando foram avaliadas as amostras sangüíneas dentro de cada grupo experimental, ou seja, no Grupo SN (p<0,001), no Grupo AL (p=0,041) e no Grupo LP, em que foi observada complexidade média, nos leucócitos produzindo H₂O₂ maior (p=0,001) que a complexidade média das células que não estavam produzindo H₂O₂.

Também no ensaio após fagocitose *in vitro* de SaPI (Tabela 16), avaliando-se todas as 15 amostras, foi verificado, entre as células produzindo H₂O₂, complexidade média maior (p<0,001) que a complexidade média das células que não estavam produzindo H₂O₂.

Tabela 16 – Comparação entre o SSC (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários)¹, em função da produção intracelular de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) após estímulo com fagocitose *in vitro* de SaPI², de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental³ – São Paulo – 2007

H ₂ O ₂	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Produzindo	222,67 ($\pm$ 11,29) ^{Aa}	179,62 ($\pm$ 46,55) ^{Aab}	140,79 ($\pm$ 16,83) ^{Ab}	=0,003	181,03 ($\pm$ 43,98) ^A
Não produzindo	99,76 ($\pm$ 13,57) ^{Ba}	110,65 ($\pm$ 21,20) ^{Ba}	72,69 ($\pm$ 4,92) ^{Bb}	=0,005	94,37 ($\pm$ 21,47) ^B
p	<0,001	=0,010	<0,001		<0,001

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ³ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL:

vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente.

Pela tabela 16, nota-se que esta diferença também se manteve, após estímulo *in vitro* com fagocitose de SaPI, quando foram avaliadas as amostras do Grupo SN ($p < 0,001$), do Grupo AL ($p = 0,010$) e do Grupo LP ($p < 0,001$).

5.2.1.8 Intensidade de fluorescência

Na tabela 17 estão agrupados os dados referentes à intensidade média de fluorescência do DCF em valores arbitrários, verificada por citometria de fluxo, das células produzindo H_2O_2 , frente diferentes estímulos *in vitro*.

Tabela 17 – Intensidade de fluorescência (média $\pm$ desvio padrão de valores arbitrários)¹ de leucócitos sanguíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, produzindo peróxido de hidrogênio intracelular frente diferentes estímulos *in vitro*, verificadas por citometria de fluxo (FL1), separados em função do grupo experimental² – São Paulo – 2007

Estímulo ³	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Sem estímulo	34,25 ($\pm 7,92$) ^{Aa}	32,17 ($\pm 3,69$) ^{Aa}	21,59 ($\pm 3,63$) ^{Ab}	=0,007	29,34 ($\pm 7,65$) ^A
Adição <i>in vitro</i> de PMA	97,53 ($\pm 3,49$) ^{Ba}	86,80 ($\pm 26,90$) ^{Ba}	28,81 ($\pm 21,65$) ^{Bb}	<0,001	71,06 ($\pm 36,35$) ^B
Adição <i>in vitro</i> de LPS	55,79 ($\pm 16,87$) ^{ACa}	48,53 ($\pm 6,04$) ^{Aa}	22,25 ($\pm 2,96$) ^{Ab}	=0,001	42,19 ($\pm 17,80$) ^A
Fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI	68,00 ($\pm 22,50$) ^{BCa}	51,67 ($\pm 13,85$) ^{Aa}	21,93 ($\pm 1,98$) ^{Ab}	=0,002	47,18 ($\pm 24,27$) ^A
p	<0,001	<0,001	=0,005		<0,001

¹ Valores com letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Valores com letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ³ PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio.

Verificou-se, quando avaliado a intensidade média de fluorescência de todas as células que estavam produzindo H_2O_2 (15 amostras), que, no ensaio com estímulo através da adição *in vitro* de PMA, a intensidade média de fluorescência (Tabela 17), foi maior ($p < 0,001$) que aquela observada nas células que estavam produzindo H_2O_2 nos demais ensaios (Figura 23).

¹ SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ² PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo experimental, diferença com $p \leq 0,05$.

Figura 23 – Produção intracelular de peróxido de hidrogênio (em valores arbitrários de fluorescência), frente diferentes estímulos *in vitro*, verificada em leucócitos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

Observando-se apenas as amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo AL ($p < 0,001$) e do Grupo LP ($p = 0,005$), a intensidade média de fluorescência das células que estavam produzindo H_2O_2 , no ensaio com estímulo *in vitro* com PMA, também foi maior que aquela observada nas células que estavam produzindo H_2O_2 nos demais ensaios (Tabela 17 e Figura 23).

Contudo, verificando-se apenas as amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN (Tabela 17), notou-se que a intensidade média de fluorescência das células que estavam produzindo H_2O_2 no ensaio com estímulo *in vitro* com PMA, foi maior ($p < 0,001$) que aquela observada nas células que estavam produzindo H_2O_2 nos ensaios com adição de LPS e sem estímulo *in vitro*, não diferindo daquela observada no ensaio com estímulo por fagocitose. Por sua vez, entre as células deste grupo experimental, a intensidade média de fluorescência daquelas que estavam produzindo H_2O_2 no ensaio com estímulo por fagocitose foi maior que aquela verificada nos leucócitos sem estímulo *in vitro*, não diferindo daquela observada no

ensaio com adição de LPS. Enquanto a intensidade média observada nas células que estavam produzindo H_2O_2 no ensaio com adição de LPS não diferiu daquela observada no ensaio sem estímulo *in vitro* (Figura 23).

Verifica-se, pela tabela 17, que, no ensaio sem estímulo *in vitro*, intensidade média de fluorescência dos leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP, foi menor ($p=0,007$) tanto daquela verificada nas células das amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo AL, quanto daquela observada nos leucócitos das amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN. Neste ensaio, a intensidade média de fluorescência dos leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 não diferiu entre as amostras sanguíneas obtidas de animais do Grupo SN e do Grupo AL (Tabela 17 e Figura 24).

¹ PMA: 12-miristato 13-acetato de forbol; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*; SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ² SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Valores com letras diferentes em um mesmo ensaio, diferença com $p \leq 0,001$.

Figura 24 – Produção intracelular de peróxido de hidrogênio (em valores arbitrários de fluorescência), frente diferentes ensaios, verificada em leucócitos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

Observa-se, pela tabela 13 e pela figura 24, que tal comportamento dos leucócitos que

estavam produzindo H_2O_2 , nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP, foi constante nos demais ensaios. No ensaio com estímulo *in vitro* por adição de PMA ($p < 0,001$), após estímulo *in vitro* com LPS ($p = 0,001$) e no ensaio após estímulo com fagocitose *in vitro* de SaPI ($p = 0,002$), a intensidade média de fluorescência do DCF, nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP, foi menor que aquela verificada nas células das amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo AL, e que aquela observada nos leucócitos das amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN. Nestes ensaios, também, a intensidade média de fluorescência dos leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 não diferiu entre as amostras sangüíneas obtidas de animais do Grupo SN e do Grupo AL.

5.2.2 Avaliação da fagocitose por citometria de fluxo

Na avaliação da produção intracelular de H_2O_2 , com estímulo através da fagocitose *in vitro* de SaPI, foi possível, também, a análise da intensidade desta fagocitose, por meio da mensuração da intensidade da fluorescência do iodeto de propídio (FL2), à citometria de fluxo. Os resultados deste ensaio estão compilados na tabela 18.

Nas figuras 56 a 58, em que estão representados histogramas da quantidade de leucócitos, em função da fagocitose de Sa-PI, podem ser observadas as diferenças nas porcentagens de células realizando fagocitose, bem como na intensidade de fagocitose de leucócitos obtidos de animais pertencentes a cada um dos três grupos experimentais.

Tabela 18 – Avaliação ¹ da fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI ² , por citometria de fluxo, de leucócitos obtidos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental ³ – São Paulo – 2007					
	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Células SaPI ⁽⁺⁾ ⁴ (%)	12,90 ^a	14,70 ^a	7,20 ^b	=0,047	11,60
FSC médio					
SaPI ⁽⁺⁾	254,22 ^{Aa}	264,30 ^{Aa}	280,51 ^{Aa}	>0,05	266,34 ^A
SaPI ⁽⁻⁾	181,29 ^{Ba}	179,82 ^{Ba}	163,02 ^{Ba}	>0,05	174,71 ^B
p	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001
SSC médio					
SaPI ⁽⁺⁾	273,80 ^{Aa}	235,20 ^{Ab}	239,15 ^{Ab}	=0,014	249,42 ^A
SaPI ⁽⁻⁾	155,44 ^{Ba}	110,55 ^{Bb}	88,38 ^{Bb}	<0,001	118,12 ^B
p	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001
Intensidade média de fluorescência	25,18 ^a	29,50 ^a	17,43 ^b	<0,001	24,04

¹ Para letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Para letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ³ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ⁴ SaPI⁽⁺⁾: células fagocitando SaPI; SaPI⁽⁻⁾: células não fagocitando SaPI.

5.2.2.1 Porcentagem de leucócitos realizando fagocitose

Verifica-se, na tabela 18, que, entre as amostras sanguíneas dos animais do Grupo SN, a porcentagem média de células realizando fagocitose não diferiu da média observada entre as amostras sanguíneas dos animais do Grupo AL. Contudo, ambas foram maiores (p=0,047) que aquela verificada entre as amostras sanguíneas dos animais do Grupo LP (Figura 25).

¹ SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Valores com letras diferentes, diferença com $p=0,047$.

Figura 25 – Porcentagem de leucócitos fagocitando *Staphylococcus aureus*, avaliada por citometria de fluxo em amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

5.2.2.2 Tamanho das células

Avaliando-se os ensaios de fagocitose, verificou-se que (Tabela 18), entre todas as 15 amostras, as células que estavam fagocitando obtiveram tamanho médio (segundo valores arbitrários de FSC) maior ($p<0,001$) que o tamanho médio das células que não estavam fagocitando. Verificou-se, também, que esta diferença manteve-se ($p<0,001$) dentro de cada grupo experimental (Figura 26).

¹ SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Valores com letras diferentes, diferença com $p \leq 0,001$.

Figura 26 – Tamanho médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) em relação à fagocitose de *Staphylococcus aureus*, em amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

Além disso, observou-se que o tamanho médio dos leucócitos que estavam fagocitando não diferiu entre os grupos experimentais. O mesmo ocorrendo com o tamanho médio das células que não estavam fagocitando (Tabela 18 e Figura 27).

¹ SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo, diferença com $p \leq 0,001$.

Figura 27 – Tamanho médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) em função do grupo experimental, em amostras sangüíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação à fagocitose de *Staphylococcus aureus* – São Paulo – 2007

5.2.2.3 Complexidade das células

A partir dos ensaios de fagocitose, verificou-se também que, entre todas as amostras (Tabela 18), as células que estavam fagocitando obtiveram complexidade (segundo valores arbitrários de SSC) média maior ($p < 0,001$) que a complexidade média das células que não estavam fagocitando. Avaliando-se as amostras sangüíneas pertencentes a cada grupo experimental, verificou-se que esta diferença manteve-se ($p < 0,001$) (Figura 28).

¹ SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo, diferença com $p \leq 0,001$.

Figura 28 – Valores de SSC médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) em relação à fagocitose de *Staphylococcus aureus*, em amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

Além disso, observa-se, na tabela 18 que a complexidade média dos leucócitos que estavam fagocitando nas amostras pertencentes aos animais do Grupo SN foi maior ($p=0,014$) que aquela verificada nas células obtidas das amostras dos animais do Grupo LP e do Grupo AL. A complexidade média dos leucócitos que estavam fagocitando nas amostras pertencentes aos animais do Grupo LP não diferiu daquela verificada nos leucócitos que estavam fagocitando nas amostras pertencentes aos animais do Grupo AL (Figura 29).

¹ SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo, diferença com $p \leq 0,05$.

Figura 29 – Valores de SCC médio de leucócitos (em unidades arbitrárias) em função do grupo experimental, em amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação à fagocitose de *Staphylococcus aureus* – São Paulo – 2007

Do mesmo modo (Tabela 18), a complexidade média das células que não estavam fagocitando obtidos das amostras pertencentes aos animais do Grupo SN foi maior ($p < 0,001$) que aquela observada nos leucócitos obtidos das amostras dos animais do Grupo LP e do Grupo AL. A complexidade média dos leucócitos que não estavam fagocitando obtidos das amostras pertencentes aos animais do Grupo LP não diferiu daquela verificada nos leucócitos que não estavam fagocitando nas amostras pertencentes aos animais do Grupo AL (Figura 29).

5.2.2.4 Intensidade de fluorescência

Pela tabela 18, observa-se que a intensidade média de fluorescência do iodeto de propídio (em unidades arbitrárias) nos leucócitos que estavam fagocitando, entre as células obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP foi menor ($p < 0,001$) que aquela observada entre

as células de animais pertencentes ao Grupo AL, e que aquela observada entre as células de animais pertencentes ao Grupo SN (Figura 30).

¹ SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Valores com letras diferentes em um mesmo grupo experimental, diferença com $p \leq 0,001$.

Figura 30 – Intensidade de fagocitose de *Staphylococcus aureus* (em valores arbitrários de fluorescência do iodeto de propídio), verificada em leucócitos de amostras sanguíneas de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental – São Paulo – 2007

A intensidade média de fluorescência dos leucócitos que estavam fagocitando, entre as células obtidas de animais pertencentes ao Grupo AL, por sua vez, não diferiu daquela verificada nas células obtidas de animais do Grupo SN (Tabela 18 e Figura 30).

5.2.3 Avaliação da produção de H_2O_2 em função da fagocitose

No ensaio avaliação da produção intracelular de H_2O_2 após estímulo por fagocitose *in vitro* de SaPI, foi possível, a partir da análise conjunta das fluorescências do DCF (FL1) e do iodeto de propídio (FL2), avaliar tal produção em função do leucócito estar, ou não, fagocitando. Para tanto, as células foram reunidas nos seguintes subgrupos:

- Leucócitos produzindo H_2O_2 e, também, fagocitando SaPI – $H_2O_2^{(+)} - SaPI^{(+)}$;
- Leucócitos produzindo H_2O_2 sem estar fagocitando SaPI – $H_2O_2^{(+)} - SaPI^{(-)}$;
- Leucócitos não produzindo H_2O_2 , mas fagocitando SaPI – $H_2O_2^{(-)} - SaPI^{(+)}$;
- Leucócitos não produzindo H_2O_2 , nem fagocitando SaPI – $H_2O_2^{(-)} - SaPI^{(-)}$.

5.2.3.1 Porcentagem de leucócitos em cada subgrupo

Verifica-se, na tabela 19, que as porcentagens de células pertencentes a um mesmo subgrupo não diferiram entre os grupos experimentais (Figura 31).

Nas figuras 53 a 55, em que estão representados citogramas de leucócitos obtidos de animais pertencentes aos três grupos experimentais em função da sua produção de H_2O_2 e da fagocitose de Sa-PI, podem ser observadas as proporções de células referentes a cada subgrupo.

Tabela 19 – Porcentagens médias de leucócitos¹ sanguíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, verificadas por citometria de fluxo, em relação à produção intracelular de peróxido de hidrogênio frente à fagocitose *in vitro* de SaPI², separados em função do grupo experimental³ – São Paulo – 2007

Subgrupo ⁴	Grupo experimental			Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)	
$H_2O_2^{(+)}-SaPI^{(+)}$	8,20 ^{Aa}	9,60 ^{Aa}	5,00 ^{Aa}	7,60 ^A
$H_2O_2^{(+)}-SaPI^{(-)}$	48,00 ^{Ba}	33,00 ^{Ba}	38,00 ^{Ba}	39,67 ^B
$H_2O_2^{(-)}-SaPI^{(+)}$	5,20 ^{Aa}	6,00 ^{Aa}	2,40 ^{Aa}	4,53 ^A
$H_2O_2^{(-)}-SaPI^{(-)}$	38,80 ^{Ba}	51,40 ^{Ba}	54,20 ^{Ba}	48,13 ^B

¹ Para letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com $p < 0,001$. ² SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ³ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ⁴ $H_2O_2^{(+)}-SaPI^{(+)}$: leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) intracelular e, também, fagocitando SaPI; $H_2O_2^{(+)}-SaPI^{(-)}$: leucócitos produzindo H_2O_2 intracelular, sem estar fagocitando SaPI; $H_2O_2^{(-)}-SaPI^{(+)}$: leucócitos não produzindo H_2O_2 intracelular, mas fagocitando SaPI; e $H_2O_2^{(-)}-SaPI^{(-)}$: leucócitos não produzindo H_2O_2 intracelular, nem fagocitando SaPI.

Avaliando-se os leucócitos de amostras sanguíneas obtidas de animais em cada grupo experimental (Tabela 19), observou-se que as porcentagens de células pertencentes ao subgrupo $H_2O_2^{(+)}-SaPI^{(-)}$ não diferiram daquelas do subgrupo $H_2O_2^{(-)}-SaPI^{(-)}$. No entanto, ambas populações celulares foram mais frequentes ($p < 0,001$) que as pertencentes aos subgrupos $H_2O_2^{(+)}-SaPI^{(+)}$ e $H_2O_2^{(-)}-SaPI^{(+)}$, que, por sua vez, não diferiram entre si (Figuras

31 e 32).

¹ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ² Subgrupo H₂O₂⁽⁺⁾-SaPI⁽⁺⁾: leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) intracelular e, também, fagocitando SaPI; H₂O₂⁽⁺⁾-SaPI⁽⁻⁾: leucócitos produzindo H₂O₂ intracelular, sem estar fagocitando SaPI; H₂O₂⁽⁻⁾-SaPI⁽⁺⁾: leucócitos não produzindo H₂O₂ intracelular, mas fagocitando SaPI; e H₂O₂⁽⁻⁾-SaPI⁽⁻⁾: leucócitos não produzindo H₂O₂ intracelular, nem fagocitando SaPI. Para letras diferentes, diferença com p<0,001.

Figura 31 – Porcentagens médias de leucócitos sanguíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, verificadas por citometria de fluxo, em relação à produção intracelular de peróxido de hidrogênio frente à fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, separados em função do grupo experimental² – São Paulo – 2007

¹ Subgrupo H₂O₂⁽⁺⁾-SaPI⁽⁺⁾: leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) intracelular e, também, fagocitando *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio; H₂O₂⁽⁺⁾-SaPI⁽⁻⁾: leucócitos produzindo H₂O₂ intracelular, sem estar fagocitando SaPI; H₂O₂⁽⁻⁾-SaPI⁽⁺⁾: leucócitos não produzindo H₂O₂ intracelular, mas fagocitando SaPI; e H₂O₂⁽⁻⁾-SaPI⁽⁻⁾: leucócitos não produzindo H₂O₂ intracelular, nem fagocitando SaPI. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Para letras diferentes, diferença com p<0,001.

Figura 32 – Porcentagens médias de leucócitos sanguíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao subgrupo, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

5.2.3.2 Tamanho das células

Nota-se na tabela 20 que, a partir dos ensaios de fagocitose, verificou-se que, entre todas as 15 amostras, as células que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁺⁾ – SaPI⁽⁺⁾ alcançaram tamanho médio maior (p<0,001) que o tamanho médio das células pertencentes aos demais subgrupos. Já as células que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁻⁾ – SaPI⁽⁻⁾ alcançaram tamanho médio menor (p<0,001) entre os leucócitos dos quatro subgrupos (Figura 33).

Tabela 20 – Valores (arbitrários)¹ de FSC médio de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação à produção intracelular de peróxido de hidrogênio frente à fagocitose *in vitro* de SaPI², separados em função do grupo experimental³ – São Paulo – 2007

Subgrupo ⁴	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
H ₂ O ₂ ⁽⁺⁾ -SaPI ⁽⁺⁾	258,60 ^{Aa}	327,70 ^{Aa}	333,10 ^{Aa}	>0,05	307,15 ^A
H ₂ O ₂ ⁽⁺⁾ -SaPI ⁽⁻⁾	188,93 ^{Ba}	230,50 ^{Ba}	189,97 ^{Ba}	>0,05	203,15 ^B
H ₂ O ₂ ⁽⁻⁾ -SaPI ⁽⁺⁾	252,41 ^{Aa}	217,10 ^{Ba}	193,34 ^{Bb}	=0,006	221,14 ^B
H ₂ O ₂ ⁽⁻⁾ -SaPI ⁽⁻⁾	171,40 ^{Ba}	169,70 ^{Ba}	150,74 ^{Ca}	>0,05	163,95 ^C
p	<0,001	=0,002	<0,001		<0,001

¹ Para letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Para letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ³ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ⁴ H₂O₂⁽⁺⁾-SaPI⁽⁺⁾: leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) intracelular e, também, fagocitando SaPI; H₂O₂⁽⁺⁾-SaPI⁽⁻⁾: leucócitos produzindo H₂O₂ intracelular, sem estar fagocitando SaPI; H₂O₂⁽⁻⁾-SaPI⁽⁺⁾: leucócitos não produzindo H₂O₂ intracelular, mas fagocitando SaPI; e H₂O₂⁽⁻⁾-SaPI⁽⁻⁾: leucócitos não produzindo H₂O₂ intracelular, nem fagocitando SaPI.

Analisando-se as amostras sangüíneas pertencentes a cada grupo experimental, na tabela 20, verificou-se que também houve diferença dentro de cada grupo, em relação ao tamanho médio das células em cada subgrupo (Figura 33).

Nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo SN, os leucócitos que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁺⁾ – SaPI⁽⁺⁾ alcançaram tamanho médio que não diferiu do tamanho médio das células pertencentes ao subgrupo H₂O₂⁽⁻⁾ – SaPI⁽⁺⁾. Entretanto, ambos foram maiores (p<0,001) que o tamanho médio das células que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁺⁾ – SaPI⁽⁻⁾; e das células que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁻⁾ – SaPI⁽⁻⁾ (Figura 33).

Nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo AL, os leucócitos que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁺⁾ – SaPI⁽⁺⁾ obtiveram tamanho médio maior (p=0,002) que o tamanho médio das células pertencentes aos demais subgrupos, que não diferiram entre si (Figura 33).

E, nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP, os leucócitos que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁺⁾ – SaPI⁽⁺⁾ atingiram tamanho médio maior (p<0,001) que o tamanho médio das células pertencentes aos demais subgrupos. Já as células que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁻⁾ – SaPI⁽⁻⁾ alcançaram o tamanho médio menor (p<0,001) entre os leucócitos dos quatro subgrupos (Figura 33).

¹ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ² Subgrupo H₂O₂⁽⁺⁾-SaPI⁽⁺⁾: leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) intracelular e, também, fagocitando SaPI; H₂O₂⁽⁺⁾-SaPI⁽⁻⁾: leucócitos produzindo H₂O₂ intracelular, sem estar fagocitando SaPI; H₂O₂⁽⁻⁾-SaPI⁽⁺⁾: leucócitos não produzindo H₂O₂ intracelular, mas fagocitando SaPI; e H₂O₂⁽⁻⁾-SaPI⁽⁻⁾: leucócitos não produzindo H₂O₂ intracelular, nem fagocitando SaPI. Para letras diferentes em um mesmo grupo, diferença com p<0,01.

Figura 33 – Valores (arbitrários) de FSC médio de leucócitos sanguíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação à produção intracelular de peróxido de hidrogênio frente à fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

Além disso, verifica-se na tabela 20, que o tamanho médio dos leucócitos que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁺⁾ – SaPI⁽⁺⁾ não diferiu entre os grupos experimentais. O mesmo ocorrendo com o tamanho médio das células que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁺⁾ – SaPI⁽⁻⁾ e daquelas que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁻⁾ – SaPI⁽⁻⁾. Todavia, o tamanho médio dos leucócitos que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁻⁾ – SaPI⁽⁺⁾ entre as células obtidas de animais do Grupo LP foi menor (p=0,006) que aquele verificado nos leucócitos que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁻⁾ – SaPI⁽⁺⁾ entre as células obtidas de animais do Grupo SN e do Grupo AL (Figura 34).

¹ Subgrupo $H_2O_2^{(+)}-SaPI^{(+)}$: leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) intracelular e, também, fagocitando *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio; $H_2O_2^{(+)}-SaPI^{(-)}$: leucócitos produzindo H_2O_2 intracelular, sem estar fagocitando SaPI; $H_2O_2^{(-)}-SaPI^{(+)}$: leucócitos não produzindo H_2O_2 intracelular, mas fagocitando SaPI; e $H_2O_2^{(-)}-SaPI^{(-)}$: leucócitos não produzindo H_2O_2 intracelular, nem fagocitando SaPI. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Para letras diferentes em um mesmo subgrupo, diferença com $p=0,006$.

Figura 34 – Valores (arbitrários) de FSC médio de leucócitos sanguíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao subgrupo, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

5.2.3.3 Complexidade das células

Verificou-se que, entre todas as 15 amostras, as células que pertenciam ao subgrupo $H_2O_2^{(+)}-SaPI^{(+)}$ alcançaram complexidade média maior ($p<0,001$) que a complexidade média (em valores arbitrários de SSC) das células pertencentes aos demais subgrupos (Tabela 21). Já as células que pertenciam ao subgrupo $H_2O_2^{(-)}-SaPI^{(-)}$ alcançaram a complexidade média menor ($p<0,001$) entre os leucócitos dos quatro subgrupos. As complexidades médias das células pertencentes aos subgrupos $H_2O_2^{(+)}-SaPI^{(-)}$ e $H_2O_2^{(-)}-SaPI^{(+)}$ não diferiram entre si (Figura 35).

Tabela 21 – Valores (arbitrários)¹ de SSC médio de leucócitos sangüíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação à produção intracelular de peróxido de hidrogênio frente à fagocitose *in vitro* de SaPI², separados em função do grupo experimental³ – São Paulo – 2007

Subgrupo ⁴	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
H ₂ O ₂ ⁽⁺⁾ -SaPI ⁽⁺⁾	334,21 ^{Aa}	307,30 ^{Aa}	298,10 ^{Aa}	>0,05	313,20 ^A
H ₂ O ₂ ⁽⁺⁾ -SaPI ⁽⁻⁾	202,49 ^{Ba}	155,70 ^{Ba}	120,26 ^{Bb}	=0,001	159,50 ^B
H ₂ O ₂ ⁽⁻⁾ -SaPI ⁽⁺⁾	206,21 ^{Ba}	180,50 ^{Ba}	147,50 ^{Bb}	=0,006	178,08 ^B
H ₂ O ₂ ⁽⁻⁾ -SaPI ⁽⁻⁾	81,75 ^{Ca}	93,62 ^{Ba}	69,29 ^{Cb}	=0,007	81,51 ^C
p	<0,001	<0,001	<0,001		<0,001

¹ Para letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Para letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ³ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ⁴ H₂O₂⁽⁺⁾-SaPI⁽⁺⁾: leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) intracelular e, também, fagocitando SaPI; H₂O₂⁽⁺⁾-SaPI⁽⁻⁾: leucócitos produzindo H₂O₂ intracelular, sem estar fagocitando SaPI; H₂O₂⁽⁻⁾-SaPI⁽⁺⁾: leucócitos não produzindo H₂O₂ intracelular, mas fagocitando SaPI; e H₂O₂⁽⁻⁾-SaPI⁽⁻⁾: leucócitos não produzindo H₂O₂ intracelular, nem fagocitando SaPI.

Ainda, analisando-se as amostras sangüíneas pertencentes a cada grupo experimental, verificou-se que este comportamento foi semelhante nos grupos SN e LP (Figura 35).

No entanto, nas amostras obtidas de animais pertencentes ao Grupo AL, os leucócitos que pertenciam ao subgrupo H₂O₂⁽⁺⁾ – SaPI⁽⁺⁾ obtiveram complexidade média maior (p<0,001) que aquela das células pertencentes aos demais subgrupos, que não diferiram entre si (Tabela 21 e Figura 35).

¹ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. ² Subgrupo $H_2O_2^{(+)}-SaPI^{(+)}$: leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) intracelular e, também, fagocitando SaPI; $H_2O_2^{(+)}-SaPI^{(-)}$: leucócitos produzindo H_2O_2 intracelular, sem estar fagocitando SaPI; $H_2O_2^{(-)}-SaPI^{(+)}$: leucócitos não produzindo H_2O_2 intracelular, mas fagocitando SaPI; e $H_2O_2^{(-)}-SaPI^{(-)}$: leucócitos não produzindo H_2O_2 intracelular, nem fagocitando SaPI. Para letras diferentes em um mesmo grupo, diferença com $p < 0,001$.

Figura 35 – Valores (arbitrários) de SSC médio de leucócitos sanguíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação à produção intracelular de peróxido de hidrogênio frente à fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

Além disso, verificou-se que a complexidade média dos leucócitos que pertenciam ao subgrupo $H_2O_2^{(+)} - SaPI^{(+)}$ não diferiu entre os grupos experimentais. Entretanto, a complexidade média das células que pertenciam ao subgrupo $H_2O_2^{(+)} - SaPI^{(-)}$ ($p=0,001$), dos leucócitos que pertenciam ao subgrupo $H_2O_2^{(-)} - SaPI^{(+)}$ ($p=0,006$) e dos que pertenciam ao subgrupo $H_2O_2^{(-)} - SaPI^{(-)}$ ($p=0,007$), obtidos dos animais pertencentes ao Grupo LP, foram menores que aquelas verificadas nos leucócitos que pertenciam a estes subgrupos, obtidos de animais do Grupo SN e do Grupo AL (Tabela 21 e Figura 36).

¹ Subgrupo H₂O₂⁽⁺⁾-SaPI⁽⁺⁾: leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) intracelular e, também, fagocitando *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio; H₂O₂⁽⁺⁾-SaPI⁽⁻⁾: leucócitos produzindo H₂O₂ intracelular, sem estar fagocitando SaPI; H₂O₂⁽⁻⁾-SaPI⁽⁺⁾: leucócitos não produzindo H₂O₂ intracelular, mas fagocitando SaPI; e H₂O₂⁽⁻⁾-SaPI⁽⁻⁾: leucócitos não produzindo H₂O₂ intracelular, nem fagocitando SaPI. ² Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Para letras diferentes em um mesmo subgrupo, diferença com p<0,01.

Figura 36 – Valores (arbitrários) de SSC médio de leucócitos sanguíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao subgrupo, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

5.2.3.4 Intensidade da produção de H₂O₂ em função da fagocitose

Nos ensaios de fagocitose, verificou-se que, entre todas as amostras que estavam produzindo H₂O₂ (caracterizadas por valores arbitrários de fluorescência do DCF), as células que estavam fagocitando (caracterizadas por valores arbitrários de fluorescência do iodeto de propídio) apresentaram intensidade média de fluorescência do DCF (Tabela 22) maior (p=0,043) que a intensidade média de fluorescência do DCF das células que não estavam fagocitando (Figura 37).

Tabela 22 – Intensidade média¹ de produção intracelular de peróxido de hidrogênio (em valores arbitrários de fluorescência) de leucócitos sanguíneos de 15 vacas da raça Holandês Preto e Branco, frente à fagocitose *in vitro* de SaPI², separados em função do grupo experimental³ – São Paulo – 2007

Fagocitose	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Ocorrendo	158,00 ^{Aa}	109,00 ^{Aa}	33,08 ^{Ab}	=0,016	100,00 ^A
Não ocorrendo	58,50 ^{Ba}	46,73 ^{Ba}	20,79 ^{Ab}	=0,001	42,01 ^B
p	=0,024	=0,002	>0,05		=0,043

¹ Para letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Para letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ³ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente.

Esta diferença (Tabela 22) manteve-se quando avaliadas as amostras coletadas de animais pertencentes ao Grupo SN (p=0,024) e Grupo AL (p=0,002). Entretanto, nas amostras obtidas de animais do Grupo LP, as células que estavam fagocitando apresentaram intensidade média de fluorescência do DCF que não diferiu da intensidade média de fluorescência das células que não estavam fagocitando (Figura 37).

¹ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Para letras diferentes em um mesmo grupo, diferença com p<0,05.

Figura 37 – Intensidade média de fluorescência (em valores arbitrários) de leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio intracelular frente à fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, separados em função do grupo experimental – São Paulo – 2007

Verifica-se, também, na tabela 22, que a intensidade média de fluorescência do DCF nos leucócitos que estavam fagocitando, entre as células obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP, foi menor ($p=0,016$) que aquela observada entre as células de animais pertencentes ao Grupo AL e que aquela observada entre as células de animais pertencentes ao Grupo SN, que não diferiram entre si. E a intensidade média de fluorescência do DCF nos leucócitos que não estavam fagocitando, também foi menor ($p=0,001$) entre as células obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP que aquela observada entre as células de animais pertencentes ao Grupo AL e que aquela observada entre as células de animais pertencentes ao Grupo SN, que também não diferiram entre si (Figura 38).

Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Para letras diferentes em um mesmo grupo, diferença com $p<0,05$.

Figura 38 – Intensidade média de fluorescência (em valores arbitrários) de leucócitos produzindo peróxido de hidrogênio intracelular em função da fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, separados por grupo experimental – São Paulo – 2007

5.2.3.5 Intensidade da fagocitose em função da produção de H_2O_2

Na tabela 23 observa-se que, entre todas as células que estavam fagocitando (segundo valores arbitrários de fluorescência do iodeto de propídio – FL2), que aquelas que estavam produzindo H_2O_2 (caracterizadas por valores arbitrários de fluorescência do DCF – FL1) apresentaram intensidade média de fluorescência do iodeto de propídio maior ($p=0,050$) que a intensidade média das células que não estavam fagocitando (Figura 39).

Tabela 23 – Intensidade média de fluorescência do iodeto de propídio (em valores arbitrários) ¹ de leucócitos, após fagocitose <i>in vitro</i> de SaPI ² , frente à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) intracelular, separados em função do grupo experimental ³ – São Paulo – 2007					
Produção intracelular de H_2O_2	Grupo experimental			p	Total
	Grupo SN (n=5)	Grupo AL (n=5)	Grupo LP (n=5)		
Ocorrendo	30,23 ^{Aa}	41,70 ^{Aa}	20,15 ^{Aa}	>0,05	30,69 ^A
Não ocorrendo	24,36 ^{Ba}	24,69 ^{Ba}	15,64 ^{Ab}	=0,007	21,57 ^B
p	<0,001	<0,001	>0,05		=0,050

¹ Para letras minúsculas diferentes em uma mesma linha, diferença com p indicado na penúltima coluna. Para letras maiúsculas diferentes em uma mesma coluna, diferença com p indicado na última linha. ² SaPI: *Staphylococcus aureus* conjugado com iodeto de propídio. ³ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente.

Verifica-se na tabela 23, também, que esta diferença entre os leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 e aqueles que não estavam, em células fagocitando SaPI, manteve-se quando avaliadas as amostras coletadas de animais pertencentes ao Grupo SN e nas células obtidas de animais do Grupo AL ($p<0,001$). Todavia, em amostras obtidas de animais do Grupo LP, a intensidade média de fluorescência das células que estavam produzindo H_2O_2 não diferiram da intensidade média de fluorescência das células que não estavam produzindo H_2O_2 (Figura 39).

¹ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo PL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Para letras diferentes em um mesmo grupo, diferença com $p < 0,05$.

Figura 39 – Intensidade média de fluorescência do iodeto de propídio (em valores arbitrários), em leucócitos realizando fagocitose de *Staphylococcus aureus*, em função da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) intracelular, separados por grupo experimental – São Paulo – 2007

Ainda, na tabela 23, verifica-se que, entre os leucócitos que estavam fagocitando, a intensidade média de fluorescência do iodeto de propídio, nos leucócitos que estavam produzindo H₂O₂, não diferiu entre os grupos experimentais.

¹ Grupo SN: vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; Grupo AL: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; Grupo LP: vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. Para letras diferentes em um mesmo grupo, diferença com $p < 0,05$.

Figura 40 – Intensidade média de fluorescência (em valores arbitrários) do iodeto de propídio, em leucócitos realizando fagocitose de *Staphylococcus aureus*, em relação à produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) intracelular, conforme o grupo experimental – São Paulo – 2007

Entretanto, a intensidade média de fluorescência do iodeto de propídio, nos leucócitos que não estavam produzindo H₂O₂, foi menor ($p=0,007$) entre as células obtidas de animais pertencentes ao Grupo LP que aquela observada entre as células de animais pertencentes ao Grupo AL e que aquela observada entre as células de animais pertencentes ao Grupo SN.

6 DISCUSSÃO

Com a crescente preocupação acerca das imunodeficiências primárias e secundárias, vários pesquisadores têm empregado diferentes métodos na avaliação da resposta imunológica, tanto em humanos, quanto em diferentes espécies animais.

Especificamente, a mensuração da capacidade dos fagócitos em gerar a explosão respiratória *in vitro* pode objetivar a avaliação da habilidade do hospedeiro em deflagrar uma resposta imunológica efetiva durante infecção natural ou experimental, da habilidade do patógeno em evadir esta resposta, das variações entre indivíduos, da resposta leucocitária frente diferentes estímulos ou detectar deficiências funcionais. Tal avaliação pode ser feita pela quantificação da atividade fagocítica (quer concernente à porcentagem de células realizando fagocitose, quer acerca da quantidade de bactérias internalizadas) como realizada por Szejda et al. (1984) ou, mais recentemente, por Flaminio et al. (2002) e Massoco e Palermo Neto (2003) em eqüinos; ou a partir da produção dos diferentes radicais oxidativos (O_2^- , $^{\cdot}OH$, H_2O_2 , ΔGO_2 , NO) envolvidos na eliminação do agente fagocitado (BABIOR, 1978a; 1978b; HODGSON et al., 2006).

O presente estudo buscou avaliar a influência da infecção pelo VLB na atividade oxidativa e fagocítica *in vitro* de leucócitos bovinos na fase alinfocitótica da enfermidade e na presença de LP utilizando-se da análise simultânea por citometria de fluxo.

Para tal, analisou-se, em diferentes ensaios, características celulares individuais relacionadas ao tamanho e à complexidade, bem como a fluorescência emitida pelas células após incorporação de iodeto de propídio e/ou de DCF. Neste contexto, a técnica utilizada mostrou ser célere, demandou pequeno volume sanguíneo e eliminou a necessidade de prévia separação das populações leucocitárias, conforme destacado por Vowells et al. (1995).

Das 99 fêmeas pesquisadas (todas as fêmeas com idade superior a 24 meses no plantel estudado), 37,37% foram positivas no sorodiagnóstico, por IDAG, da LEB. Tal incidência assemelha-se àquela verificada por Olson et al. (1973), que observaram incidências variando entre 24% e 42% em rebanhos leiteiros na Alemanha, e àquelas observadas em diversos levantamentos sorodiagnósticos realizados em rebanhos leiteiros brasileiros, nos quais as taxas de incidência oscilavam entre 20,7% e 53,3% (LORENZ; STRAUB, 1987).

Entre os animais soropositivos, sete (21,21%) manifestavam LP, conforme classificação indicada por Parodi (1987) e Marshak e Abt (1968), considerando-se os parâmetros indicados para fêmeas bovinas sadias, da raça Holandesa, segundo sua faixa etária (TAVORA, 1998).

Verifica-se que a incidência de animais apresentando LP observada no presente estudo foi menor que aquela ressaltada por Parodi (1987), de 30 a 70% dos animais infectados. Porém, a extensa margem apresentada pelo autor reflete a diversidade de rebanhos estudados e de métodos empregados.

No ensaio em que se avaliou a produção de radicais oxidativos por leucócitos sem prévio estímulo *in vitro*, verificou-se que, em média, 30,60% dos leucócitos obtidos das fêmeas selecionadas apresentavam produção de H_2O_2 . Apesar da ausência de estímulo *in vitro*, supõe-se que esta produção de ERO pelos leucócitos circulantes deu-se em decorrência do constante estímulo natural *in vivo* a que estão submetidas as células sanguíneas e que, em qualquer ensaio por meio do qual seja verificada a produção intracelular de EROs, exista, em maior ou menor grau, uma porcentagem de leucócitos produzindo H_2O_2 , mormente quando estas células são obtidas de animais mantidos em condições naturais. Realmente, Flaminio et al. (2002) verificaram atividade oxidativa “espontânea” em fagócitos sanguíneos de eqüinos, separados previamente por gradiente de concentração, em ensaio sem a adição de estímulos *in vitro*. Resultados semelhantes obtiveram Walrand et al. (2003), avaliando leucócitos polimorfonucleares humanos, também previamente isolados por meio de gradiente de concentração.

Como verificado nos resultados dos hemogramas dos quinze animais selecionados para os ensaios de atividade oxidativa dos leucócitos, não houve diferença entre os animais pertencentes aos grupos AL e SN com relação às contagens totais e diferenciais (absolutas e relativas) de leucócitos. Como esperado, visto que este foi o critério de seleção para animais manifestando LP, as fêmeas pertencentes a este grupo apresentaram contagens de linfócitos (absolutas e relativas) superiores às contagens encontradas nos hemogramas dos animais pertencentes aos demais grupos.

Contudo, entre as fêmeas manifestando LP, três animais apresentavam neutrofilia e um apresentou contagem absoluta de neutrófilos próxima ao limite para ser considerado como com neutrofilia, considerando-se os dados apresentados por Távora (1998). Já a outra fêmea selecionada pertencente ao grupo LP apresentou contagens absoluta e relativa de neutrófilos dentro dos valores considerados como referência para a idade e a raça. Por outro lado, a média das contagens relativas de neutrófilos verificadas nos hemogramas das fêmeas pertencentes a este grupo experimental foi menor que aquelas observadas nos hemogramas das fêmeas dos demais grupos experimentais.

Todos os dez animais pertencentes aos demais grupos experimentais, ao leucograma, apresentaram valores normais nas contagens totais e diferenciais (absolutas e relativas) de

leucócitos.

Entretanto, apesar da diferença entre as porcentagens das diferentes populações celulares observada nos hemogramas de animais pertencentes ao grupo LP, em relação aos animais constituintes dos demais grupos experimentais (especialmente relativa à menor proporção neutrófilo:linfócito circulantes em animais manifestando LP), não houve diferença na porcentagem de leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 , entre os grupos experimentais. Assim, parece-nos plausível sugerir que a infecção pelo VLB não altera a porcentagem de leucócitos circulantes produzindo H_2O_2 , sem prévio estímulo *in vitro*, em fêmeas bovinas. Não obstante, não foram encontrados, em pesquisas envolvendo a produção de EROs por leucócitos, sobretudo de bovinos, relatos acerca da porcentagem de células produzindo H_2O_2 .

Verificou-se que, em todos os grupos experimentais, leucócitos produzindo H_2O_2 tinham maior complexidade que aqueles que não estavam produzindo H_2O_2 , demonstrando que a produção intracelular de EROs aumenta a complexidade intracelular verificada pela citometria de fluxo. A característica SSC, relacionada à complexidade intracelular, é determinada, segundo McCoy (1994), pela luz refletida por estruturas internas ou por ondulações de membranas celulares (plasmática ou nuclear). Como a produção de radicais oxidativos está relacionada, também, à formação de novas estruturas intracelulares (especialmente fagossomos e fagolisossomos) (ALBERTS et al., 2002), deduz-se porque células em que ocorre produção de H_2O_2 apresentem maior complexidade à citometria de fluxo.

Já o tamanho das células não diferiu em função da produção de H_2O_2 , quando foram avaliados os leucócitos obtidos de fêmeas soronegativas e de fêmeas soropositivas sem LP, mas, os resultados do presente trabalho demonstraram que, em animais manifestando LP, os leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 eram menores que aqueles que estavam produzindo H_2O_2 . Ainda, os leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 tinham o mesmo tamanho entre os diferentes grupos experimentais. Entretanto, os leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 provenientes de animais manifestando LP apresentavam menor complexidade que aqueles obtidos de animais pertencentes aos demais grupos experimentais.

Estudos como os de Vowells et al. (1995) de Kampen et al. (2004b), que avaliaram granulócitos, e de Werling et al. (1998) e Altreuther et al. (2001), que analisaram monócitos bovinos, confirmaram as populações específicas de leucócitos com o auxílio de anticorpos monoclonais contra marcadores de superfície celular presentes em tais populações. No entanto, apesar do fato de o presente estudo não ter se utilizado de anticorpos monoclonais, as características de tamanho e complexidade verificadas, aliadas aos dados obtidos nos

hemogramas, indicam que havia uma maior proporção de linfócitos entre as células que não estavam produzindo H_2O_2 , em animais com LP.

Por sua vez, em células que estavam produzindo H_2O_2 , a produção intracelular média, sem estímulo *in vitro*, de leucócitos obtidos de animais apresentando LP foi menor que aquela verificada em células provenientes de animais soronegativos e de animais soropositivos alinfocitóticos.

Com as características de tamanho e complexidade verificadas, foi possível distinguir distintas subpopulações de leucócitos produzindo H_2O_2 em cada grupo experimental. Deste modo, leucócitos produzindo H_2O_2 obtidos de animais soronegativos tinham o mesmo tamanho que aqueles obtidos de animais manifestando LP, mas os leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 de animais de ambos os grupos eram menores que aqueles obtidos de animais do grupo AL. Já os leucócitos produzindo H_2O_2 , obtidos de animais soronegativos, apresentaram maior complexidade que aqueles obtidos de animais soropositivos, com ou sem LP. Não houve diferença, nesta característica, entre leucócitos obtidos de animais do grupo AL e aqueles obtidos de animais com LP.

Visto que, no presente trabalho, não foram utilizados anticorpos monoclonais ou a confirmação das populações de leucócitos por meio da obtenção das células, após a citometria de fluxo, e sua observação por microscopia óptica, como realizado por Massoco e Palermo Neto (2003), as características verificadas em leucócitos produzindo H_2O_2 não permitem diferenciar as populações envolvidas nesta produção, em função do grupo experimental.

Todavia, estes resultados permitem-nos presumir que, em animais infectados pelo VLB, com LP, a produção de H_2O_2 seja feita pelas mesmas populações celulares (verificadas pelas características de FSC das células) que aquela verificada em animais não infectados. No entanto, como verificado pelas características de SSC e de intensidade de produção de H_2O_2 , a produção intracelular média de H_2O_2 , em leucócitos obtidos de animais manifestando LP é menor que aquela verificada em leucócitos de animais dos demais grupos.

Por outro lado, os resultados sugerem que os leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 , em animais apresentando LP, eram constituídos, em sua maioria, por linfócitos (caracterizados, mormente, por suas características SSC).

A atividade oxidativa *in vivo* é influenciada pela ação de diversos patógenos e por múltiplos fatores imunológicos e fisiológicos. Patógenos capazes de sobreviver no meio intracelular, como *Mycobacterium avium paratuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Haemophilus somnus*, evadem-se da resposta imunológica inata e mantêm-se e multiplicam-se dentro das células do hospedeiro penetrando nas células a partir da ligação a receptores que

não deflagram a produção de radicais oxidativos ou suprimindo sua produção. De maneira semelhante, foi demonstrado que patógenos extracelulares, como *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica*, quando fagocitados, podem interferir nos mecanismos relacionados à destruição do patógeno, tais como a atividade oxidativa (revisado por HODGSON et al., 2006).

Já em infecções virais, a resposta imunológica inata impede que vírions recém inseridos no organismo penetrem nas células do hospedeiro ou, caso isto ocorra, proporcionam a apoptose prematura de células infectadas (JANEWAY et al., 2004). Para tanto, um dos principais mecanismos envolve a produção e liberação de IFN- γ por linfócitos antigenicamente estimulados. Em células infectadas por vírus, o IFN- γ liga-se a receptores específicos (CDw119), induzindo a produção de proteínas com ação antiviral (TIZARD, 2002).

Outro mecanismo envolvido na destruição de células infectadas por vírus é determinado pela atuação de células NK (ABBAS et al., 1997). Estas células, consideradas parte do sistema inato, não necessitam de prévio estímulo antigênico para destruir células infectadas e têm sua ação potencializada pelo IFN- γ . Células da linhagem monócito-macrófago também atuam na destruição de partículas virais e de células infectadas por vírus mediante fagocitose e produção de radicais oxidativos que, por sua vez, também são potencializados pela ação do IFN- γ (TIZARD, 2002).

Por outro lado, muito embora os antígenos virais deflagrem uma produção de anticorpos que pode, juntamente com o complemento, neutralizar partículas virais livres e destruir células infectadas, a resposta imunológica adquirida em infecções virais é, essencialmente, do tipo Th-1, mediada por células T citotóxicas (CD8⁺) que atuam na destruição destas células infectadas (ABBAS et al., 1997). Células infectadas por vírus são reconhecidas e eliminadas quando o antígeno viral recém transcrito é transportado para a superfície celular conjugado a moléculas do MHC de classe I (JANEWAY et al., 2004).

Segundo Tizard (2002), sob certas circunstâncias, as células T citotóxicas inativam os vírus intracelulares sem que haja a destruição ou sem desencadear a apoptose precoce da célula infectada. Para tal, a interação entre atividades antivirais específicas do IFN- γ e do TNF- α ativa duas vias virucidas sem interferir no ciclo celular.

Realmente, posto que não foi detectada viremia após infecção experimental pelo VLB (KLINTEVALL et al., 1997) e, visto que ocorre depleção de linfócitos apresentando antígenos virais em sua superfície, na fase alinfocitótica da enfermidade (LUNDBERG; SPLITTER, 2000), supõe-se que, a infecção mantém-se nesta fase por meio do balanço entre

a infecção de novas células e a eliminação de partículas virais livres e de células que expressam antígenos virais. Os estudos de Keefe et al. (1997a) e de Pyeon e Splitter (1998), complementados pelas pesquisas de Lundberg e Splitter (2000), de Beyer et al. (2002) e de Murakami et al. (2004), entretanto, indicam que a eliminação das células infectadas deva ser feita por linfócitos- $\gamma\delta$, a partir da ação do IFN- γ , por sua vez induzida pela IL-12.

Tais características divergem da via Th-1 clássica de eliminação de células infectadas por vírus, mediadas por linfócitos T citotóxicos, no entanto, não foram encontrados estudos visando a elucidação do papel desta população celular na eliminação de células infectadas pelo VLB. Da mesma forma, não foram encontradas pesquisas acerca do papel das células NK na eliminação de células infectadas pelo VLB nas fases precoces da LEB.

Por outro lado, os estudos conduzidos por Pyeon et al. (1996) e, posteriormente, por Yakobson et al. (2000), Amills et al. (2002), Debacq et al. (2003) e Konnai et al. (2005; 2006) sugerem que uma alteração no perfil de citocinas envolvidas na resposta imune celular (Th-1) para aquele encontrado na resposta humoral (Th-2) possa estar envolvida com a progressão da enfermidade para as fases de LP ou de linfossarcoma.

Além da produção quantitativa alterada de citocinas, em animais manifestando LP, verificada nos estudos conduzidos por Pyeon et al. (1996) e, posteriormente confirmada, por Yakobson et al. (2000), Amills et al. (2002), Debacq et al. (2003) e Konnai et al. (2005; 2006), Werling et al. (1995) observaram que havia alterações qualitativas em certas citocinas (especificamente IL-1 e TNF- α), que apresentavam sua atividade alterada.

A alteração no perfil de citocinas durante a evolução da LEB, mormente a maior produção de TNF- α e o desbalanço na expressão de receptores celulares de TNF, observados por Kabeya et al. (2001), pode induzir à maior sobrevivência dos linfócitos B, quer aumentando sua taxa de proliferação, quer diminuindo seu índice de apoptose, e, deste modo, conduzir o hospedeiro ao status de LP.

Entretanto, não foram encontrados estudos no intuito de elucidar a que ponto a alteração no perfil de citocinas para aquele encontrado em uma resposta imunológica primordialmente humoral (Th-2) promove uma menor destruição de células infectadas pelo VLB, se este perfil interfere na expressão de antígenos virais na superfície de células infectadas e se tais alterações são induzidas pela atividade específica do provírus do VLB.

Não obstante, tal alteração no perfil de citocinas durante fase de LP, possivelmente, interfere na atividade de outras populações celulares relacionadas ao sistema imunológico. Em especial, a menor produção de IFN- γ verificada em animais manifestando LP observada por Keefe et al. (1997a) e confirmada por Amills et al. (2002) pode ser a responsável pela

alteração da atividade oxidativa e fagocítica de leucócitos observada no presente trabalho.

No entanto, no recente estudo de Kaczmarczyk et al. (2005), em que a atividade de fagócitos foi avaliada por meio do teste de redução do NBT, não foi encontrada diferença na eficiência metabólica de fagócitos obtidos de animais soropositivos ou de animais soronegativos para LEB. Os autores, nesse estudo, não diferenciaram animais soropositivos em função da manifestação de LP. Entretanto, como o NBT é fagocitado e, então, reduzido a formazano, que é depositado no meio intracelular, e visto que a quantidade do depósito reflete a intensidade da fagocitose e da produção de radicais oxidativos (segundo ressaltado pelos próprios autores). Assim, um prévio diagnóstico diferencial entre animais manifestando LP e animais alinfocitóticos nesse estudo de Kaczmarczyk et al. (2005), poderia conduzir a resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

Watson et al. (1995) já haviam observado que a adição de substâncias estimuladoras da atividade oxidativa proporcionam uma avaliação mais acurada desta atividade, sobretudo quando da utilização de pequena quantidade de células e/ou de células com baixo índice de produção.

Além disso, Smits et al. (1997) ressaltaram que o uso de sangue total (como realizado no presente trabalho), ao invés de populações de leucócitos previamente isoladas, minimiza os riscos de contaminação por endotoxinas possivelmente presentes em reagentes utilizados para o isolamento celular (tais como substâncias utilizadas para separação celular por gradiente de concentração ou soro animal). Ainda, a incubação de bactérias ou partículas (como o *zymosan*), em ensaios para a avaliação da fagocitose, com o sangue total garante, segundo os autores, suficiente opsonização necessária para o processo fagocítico.

Deste modo, foi adicionado PMA às células recém coletadas, antes do ensaio de produção de H_2O_2 . Verificou-se, neste ensaio, que a porcentagem de células produzindo H_2O_2 aumentou para, em média, 63,13%, não diferindo em relação aos grupos experimentais. Não foram encontrados relatos acerca da intensidade do aumento proporcionado na porcentagem de células produzindo H_2O_2 após a adição *in vitro* de PMA, contudo o incremento verificado no presente trabalho, de mais de 100%, corrobora com as observações feitas por Walrand et al. (2003) e por Kampen et al. (2004b) de que o PMA, atuando como um ativador da PKC (HODGSON et al., 2006), ativa a atividade oxidativa de leucócitos.

No entanto, mesmo com tal estímulo, a produção intracelular média de H_2O_2 nos leucócitos obtidos de animais apresentando LP continuou menor que aquela verificada em células provenientes de animais soronegativos e de animais soropositivos alinfocitóticos.

Após este estímulo, o tamanho dos leucócitos produzindo H_2O_2 não diferiu entre os

grupos experimentais. Todavia, os leucócitos produzindo H_2O_2 obtidos de animais com LP tinham menor complexidade que aqueles obtidos de animais soronegativos, indicando sua menor produção de radicais oxidativos.

Por sua vez, neste ensaio, os leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 também tinham o mesmo tamanho entre os diferentes grupos experimentais. Entretanto, os leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 , provenientes de animais manifestando LP, mais uma vez, apresentaram menor complexidade que aqueles obtidos de animais pertencentes aos demais grupos experimentais, sugerindo, também em função dos resultados dos hemogramas, tratarem-se de linfócitos.

Após a adição *in vitro* de PMA, observou-se que, em todos os grupos experimentais, leucócitos produzindo H_2O_2 eram maiores que aqueles que não estavam produzindo H_2O_2 . Entretanto, enquanto a complexidade celular não diferiu entre estas subpopulações de leucócitos quando foram avaliados os leucócitos obtidos de fêmeas soropositivas sem LP (grupo AL), os leucócitos obtidos tanto de animais soronegativos, quanto de animais manifestando LP, produzindo H_2O_2 , apresentaram maior complexidade que aqueles que não estavam produzindo H_2O_2 . Tais observações sugerem tratar-se de populações celulares diferentes, entretanto tal assertiva não foi confirmada, posto que não foram utilizados anticorpos monoclonais ou observação, por microscopia óptica, das diferentes subpopulações.

Os resultados verificados neste ensaio possibilitam-nos sugerir que a adição de PMA aumenta a produção de H_2O_2 nos leucócitos estudados e que a infecção pelo VLB não altera a porcentagem de leucócitos sangüíneos apresentando tal produção. Todavia, mesmo com a adição de PMA, a produção intracelular média de H_2O_2 em leucócitos sangüíneos de animais apresentando LP, é menor que aquela verificada em células coletadas de animais pertencentes aos demais grupos.

Van Oostveldt et al. (2002) conduziram um estudo avaliando a produção de EROs por leucócitos polimorfonucleares, obtidos de vacas sadias em gestação, em função do fato deles encontrarem-se em processo de morte celular por apoptose ou por necrose, após 6 horas de incubação. Após a adição de PMA, os autores verificaram que leucócitos polimorfonucleares em processo de morte celular apresentaram menor atividade oxidativa que aqueles que não se encontravam em processo de morte. Ainda, aqueles que estavam sofrendo processo de morte por necrose apresentaram menor atividade oxidativa que aqueles que apresentavam morte celular por apoptose. Os autores concluíram, então, que ocorre menor atividade oxidativa em leucócitos polimorfonucleares nas fases iniciais e tardias do processo de morte celular e que a correlação entre apoptose e perda da função celular pode ocorrer em decorrência de defeitos

no citoesqueleto.

Supõe-se que a manutenção do estado de LP, em bovinos com LEB, ocorra em função de um desequilíbrio entre proliferação e morte de linfócitos B, o principal alvo do VLB, contudo os resultados de diferentes estudos divergem. Enquanto os trabalhos conduzidos por Konnai et al. (2005; 2006) verificaram uma maior proliferação em CMSP de animais manifestando LP, Debacq et al. (2003) observaram menor índice de morte celular, aliado a uma menor taxa de proliferação, em linfócitos B de animais infectados, com LP. Por sua vez, foi verificado que outras populações de leucócitos, como monócitos, podem ser infectados pelo VLB (HEENEY et al., 1992; MIRSKY et al., 1996; WERLING et al., 1998; DOMÉNECH et al., 2000; ALTREUTHER et al., 2001).

Deste modo, é plausível supor-se que a infecção pelo VLB, direta ou indiretamente, possa alterar os mecanismos de sinalização responsáveis pelo ciclo celular e, também por meio deste processo, interferir na atividade oxidativa de leucócitos. Convém observar que a ativação da NADPH oxidase (e, por conseguinte, da atividade oxidativa) promovida pelo PMA, por meio da ativação da PKC, não é mediada por receptores da membrana celular e não é precedida da formação do fagolisossomo (KAMPEN et al., 2004b). Deste modo, pode-se conjecturar que a influência da infecção pelo VLB na produção de H_2O_2 não ocorra apenas por meio de um desarranjo na membrana celular ou nos mecanismos envolvidos na gênese do fagolisossomo.

Quando previamente estimulados pela adição de LPS de *E. coli*, a porcentagem de leucócitos produzindo H_2O_2 aumentou para, em média, 52,00%, também não diferindo em relação aos grupos experimentais. Novamente, não foram encontrados relatos acerca da influência da adição *in vitro* de LPS na magnitude do aumento na porcentagem de leucócitos produzindo H_2O_2 , todavia, o aumento observado no presente trabalho, de cerca de 70%, legitimam sua utilização como um ativador de leucócitos, como utilizado, por exemplo, por Werling et al. (1995).

Contudo, também após este estímulo, a produção intracelular média de H_2O_2 nos leucócitos obtidos de animais apresentando LP foi menor que aquela observada em células provenientes de animais soronegativos e de animais soropositivos sem LP.

Após o estímulo com adição *in vitro* de LPS, o tamanho dos leucócitos produzindo H_2O_2 não diferiu entre os grupos experimentais. No entanto, mais uma vez, os leucócitos produzindo H_2O_2 obtidos de animais com LP apresentaram menor complexidade que aqueles obtidos de animais soronegativos, também assinalando sua menor produção de radicais oxidativos.

Por sua vez, neste ensaio, os leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 , provenientes de animais manifestando LP, apresentaram menor complexidade que aqueles obtidos de animais soropositivos que não manifestavam LP, sugerindo, aliado aos dados verificados nos hemogramas, novamente, tratarem-se, principalmente de linfócitos.

Após a adição *in vitro* de LPS, também foi observado que, em todos os grupos experimentais, leucócitos produzindo H_2O_2 apresentaram maior complexidade que aqueles que não estavam produzindo H_2O_2 . Entretanto, enquanto o tamanho das células não diferiu entre os leucócitos produzindo e não produzindo H_2O_2 , quando foram avaliados os leucócitos obtidos de fêmeas do grupo AL, os leucócitos obtidos tanto de animais soronegativos, quanto de animais manifestando LP, produzindo H_2O_2 , eram maiores que aqueles que não estavam produzindo H_2O_2 . Mais uma vez, estes resultados sugerem tratar-se de populações celulares diferentes, hipótese que não foi confirmada, visto que não foram utilizados anticorpos monoclonais nem foram observadas, por microscopia óptica, estas diferentes subpopulações.

Os resultados observados neste ensaio também possibilitam-nos sugerir que a adição de LPS aumenta a produção de H_2O_2 nos leucócitos estudados e que a infecção pelo VLB não altera a porcentagem de leucócitos sangüíneos apresentando tal produção, após este estímulo. Contudo, mesmo com a adição de LPS, a produção intracelular média de H_2O_2 em leucócitos obtidos de vacas infectadas pelo VLB, apresentando LP, é menor que aquela verificada em leucócitos coletados de animais pertencentes aos demais grupos.

Utilizando-se da fagocitose de *S. aureus* como prévio estímulo para a produção intracelular de H_2O_2 , em média, 47,47% dos leucócitos produziam esta ERO. Mais uma vez, não houve diferença entre os grupos experimentais, no entanto, o estímulo através da fagocitose não aumentou a porcentagem de células produzindo H_2O_2 , comparando-se com o ensaio sem prévio estímulo, quando foram avaliadas as células obtidas de todos os animais.

Tal aumento foi verificado apenas quando avaliados os leucócitos de animais pertencentes aos grupos SN e AL, deste modo, sugerindo que o estímulo pela fagocitose de SaPI não altera a proporção de leucócitos produzindo H_2O_2 em ensaios que contenham amostras sangüíneas de animais com LP. Tais resultados permitem-nos advertir que, em ensaios em que se busca uma maior proporção de células produzindo H_2O_2 mediante estímulo por fagocitose *in vitro* de SaPI, como aqueles realizados por Flaminio et al. (2002) e por Massoco e Palermo Neto (2003), utilizando-se de células de eqüinos, e, mais especificamente, por Smits et al. (1997) e por Kampen et al. (2004b), verificando leucócitos bovinos, deve-se constatar se as amostras sangüíneas foram obtidas de animais infectados pelo VLB, manifestando LP.

Porém, também após estímulo com fagocitose, a produção intracelular média de H_2O_2 de leucócitos obtidos de animais apresentando LP foi menor que aquela verificada em células provenientes de animais soronegativos e de animais soropositivos sem LP.

Neste ensaio, foi verificado também que a produção de H_2O_2 foi maior nas células que estavam realizando fagocitose do que em leucócitos que não estavam fagocitando, quando avaliadas as células obtidas de animais pertencentes aos grupos SN e AL. Entretanto, esta diferença não ocorreu quando analisados os leucócitos obtidos de animais apresentando LP, sugerindo que a fagocitose não aumenta a produção de H_2O_2 em leucócitos de animais com LP. Ainda, a produção de H_2O_2 , tanto em leucócitos que estavam fagocitando, quanto em células que não estavam realizando fagocitose, obtidos de animais com LP, foi menor que aquela verificada em células obtidas de animais dos demais grupos.

Verificou-se que, também após estímulo com fagocitose *in vitro*, em todos os grupos experimentais, leucócitos produzindo H_2O_2 tinham maior complexidade que aqueles que não estavam produzindo H_2O_2 . No entanto, neste ensaio, o tamanho das células não diferiu entre estas subpopulações leucocitárias quando foram avaliados os leucócitos obtidos de fêmeas soronegativas. Já os leucócitos obtidos de animais soropositivos, produzindo H_2O_2 , foram maiores que aqueles que não estavam produzindo H_2O_2 .

Também após este estímulo, o tamanho dos leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 não diferiu entre os grupos experimentais. Todavia, mais uma vez, os leucócitos produzindo H_2O_2 obtidos de animais com LP apresentaram menor complexidade que aqueles obtidos de animais soronegativos, também indicando menor atividade e, por conseguinte, menor produção de radicais oxidativos.

Neste ensaio, os leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 também tinham o mesmo tamanho, comparando-se as células obtidas de animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. Entretanto, também após estímulo por fagocitose, os leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 provenientes de animais manifestando LP apresentavam menor complexidade que aqueles obtidos de animais pertencentes aos demais grupos experimentais, mais uma vez sugerindo uma maior quantidade de linfócitos.

Deste modo, os resultados verificados neste ensaio possibilitam-nos sugerir que a infecção pelo VLB não altera a porcentagem de leucócitos sangüíneos produzindo H_2O_2 após estímulo pela fagocitose *in vitro* de SaPI. Entretanto, mesmo com tal estímulo, a produção de H_2O_2 por leucócitos de animais manifestando LP, realizando ou não a fagocitose, é menor que aquela verificada em células obtidas de animais soronegativos e em animais infectados alinfocitóticos.

Diverso da ativação promovida pelo PMA, o estímulo para a produção de H_2O_2 promovido pelo LPS de *E. coli* e pela fagocitose de *S. aureus* ocorre por meio da ligação a receptores da membrana plasmática dos leucócitos, atuando, deste modo, como estimulantes mais naturais da atividade oxidativa (KAMPEN et al., 2004b).

Assim, os resultados verificados no presente trabalho, em que a produção intracelular média de H_2O_2 , com e sem os diferentes estímulos prévios, foi menor em leucócitos obtidos de animais infectados pelo VLB, manifestando LP, permitem-nos supor que, nesta fase da infecção, direta ou indiretamente, o VLB interfere nos mecanismos de produção intracelular de H_2O_2 de leucócitos, mas não nos permitem confirmar que tal mediação ocorra, especificamente, por meio de alterações nos receptores da membrana plasmática.

A técnica de citometria de fluxo permitiu, também, a avaliação da porcentagem de células que estavam realizando fagocitose, bem como sua intensidade, por meio da medida da intensidade da fluorescência do iodeto de propídio. Destaca-se que a utilização do EDTA gelado, ao término do preparo das amostras para a avaliação por citometria de fluxo, como realizado por Massoco e Palermo Neto (2003), proporcionou a eliminação de possíveis bactérias aderidas à superfície celular (portanto, não fagocitadas), excluindo possíveis resultados incorretos.

Deste modo, foi verificada uma menor porcentagem de leucócitos realizando fagocitose entre as células obtidas de animais com LP, quando comparada à porcentagem de células realizando fagocitose nas amostras coletadas de animais pertencentes aos demais grupos. Além disso, as células provenientes de animais com LP apresentaram uma menor intensidade de fagocitose que aquelas obtidas dos animais soronegativos e soropositivos alinfocitóticos.

Em todos os grupos experimentais, leucócitos realizando fagocitose apresentaram maior tamanho e maior complexidade que aqueles que não estavam fagocitando.

Todavia, enquanto o tamanho das células que estavam realizando fagocitose não diferiu entre os grupos experimentais, sugerindo uma mesma população de leucócitos, os leucócitos obtidos de animais soronegativos tinham maior complexidade que as células obtidas de animais soropositivos. Do mesmo modo, o tamanho das células que não estavam realizando fagocitose não diferiu entre os grupos experimentais. Também nesta população de leucócitos, células obtidas de animais soronegativos tinham maior complexidade que as células obtidas de animais soropositivos.

Tais resultados permitem-nos alvitar que animais manifestando LP apresentam uma menor porcentagem de leucócitos realizando fagocitose, fato que pode ser explicado por uma maior quantidade relativa de linfócitos. No entanto, fagócitos sanguíneos obtidos de animais

com LP fagocitam menos, apontando a influência das alterações que induzem à LP na capacidade fagocítica dos leucócitos.

Este resultado corrobora com aqueles verificados por Werling et al. (1998), que observaram que havia uma menor porcentagem de monócitos realizando fagocitose e que os monócitos obtidos de animais soropositivos apresentaram menor atividade fagocítica que células coletadas de animais soronegativos. Todavia, também neste estudo, os autores não verificaram a presença de LP, fato que não permite apontar se tais observações ocorreram apenas em células obtidas de animais nesta fase da infecção.

Porém, convém observar que, segundo Smitts et al. (1997), em ensaios em que se visa mensurar a fagocitose, a incubação de bactérias com o sangue total (em oposição à incubação com populações de leucócitos previamente separadas) indica a combinação da capacidade fagocítica dos fagócitos com a atividade opsonizante do plasma.

Foi constatado, no presente estudo, que células em que estava ocorrendo produção de H_2O_2 apresentaram maior intensidade de fagocitose que aquelas nas quais não ocorria produção de H_2O_2 , quando avaliadas as células obtidas de animais pertencentes aos grupos SN e AL. Todavia, quando analisadas as células obtidas de animais manifestando LP, a intensidade de fagocitose foi a mesma em leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 e em leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 .

Assim, tais resultados permitem-nos apontar que a produção intracelular de H_2O_2 aumenta a fagocitose de SaPI por leucócitos sangüíneos obtidos de animais não infectados pelo VLB e daqueles infectados que não manifestam LP. Contudo, a produção de H_2O_2 não aumenta a fagocitose realizada por leucócitos obtidos de animais apresentando LP.

Por outro lado, a intensidade da fagocitose em leucócitos que estavam produzindo H_2O_2 não diferiu entre os grupos. Contudo, a intensidade de fagocitose em células que não estavam produzindo H_2O_2 , obtidas de animais apresentando LP foi menor que aquela verificada em leucócitos que não estavam produzindo H_2O_2 , obtidos dos animais pertencentes aos demais grupos.

Estes resultados indicam que a fagocitose realizada por leucócitos obtidos de animais manifestando LP é menor que aquela verificada em leucócitos sangüíneos de animais soronegativos ou infectados, não apresentando LP, e que tal diminuição foi verificada em células que não estavam realizando produção de H_2O_2 .

Como uma das vias pelas quais ocorre a redução do O_2 molecular à H_2O_2 requer a formação de fagossomos (JANEWAY et al., 2004), pode-se supor que este índice reduzido de fagocitose, observado em leucócitos de animais com LEB, manifestando LP, possa ser

insuficiente para promover, em algumas células, produção de H_2O_2 em níveis detectáveis pelo método empregado neste trabalho. Por outro lado, esta fagocitose reduzida pode ocorrer em uma população de leucócitos que não utiliza a H_2O_2 como principal ERO, na destruição do material fagocitado.

Mesmo assim, os resultados verificados no presente trabalho permitem-nos inferir que as alterações advindas da infecção pelo VLB que induzem à persistência da linfocitose, quer pela influência direta da atividade proviral, quer por meio de atividade secundária à alteração quantitativa e/ou qualitativa de citocinas, interferem em atividades consideradas primordiais à defesa imunológica do hospedeiro, notadamente no tocante à fagocitose e à produção de radicais oxidativos.

Não obstante, estudos avaliando animais apresentando LP voltaram-se, essencialmente, para a análise funcional ou quantitativa de linfócitos. Maior ênfase foi dada na quantificação das populações de linfócitos B e T ou na avaliação funcional de linfócitos B, a principal célula-alvo do VLB, mormente buscando-se elucidar a influência do VLB na indução da proliferação ou da apoptose de células do sistema imunológico. Ressalta-se que, até onde se pôde compilar, não foram encontrados estudos avaliando a produção de radicais oxidativos em animais infectados pelo VLB, mormente utilizando-se da metodologia empregada no presente trabalho.

7 CONCLUSÃO

Pelos métodos utilizados, foi possível observar que animais infectados pelo VLB, manifestando LP, apresentam alterações na atividade oxidativa de leucócitos sangüíneos e concluir que:

- A infecção pelo VLB em fêmeas bovinas não altera a porcentagem de leucócitos circulantes produzindo H_2O_2 , com ou sem prévio estímulo *in vitro*.
- A produção intracelular média de H_2O_2 , sem estímulo *in vitro* de leucócitos obtidos de animais apresentando LP realizando ou não realizando fagocitose, ou com a adição *in vitro* de PMA ou de LPS, é menor que aquela verificada em células provenientes de animais soronegativos e de animais soropositivos alinfocitóticos.
- A adição *in vitro* de PMA ou de LPS e a fagocitose *in vitro* de SaPI aumentam a porcentagem de leucócitos produzindo H_2O_2 , mas a fagocitose *in vitro* de SaPI não aumenta esta porcentagem, em células obtidas de fêmeas soropositivas manifestando LP.
- Animais manifestando LP apresentam porcentagem de leucócitos realizando fagocitose menor que aquela verificada em células obtidas de animais soronegativos e em animais infectados alinfocitóticos.
- Os leucócitos obtidos de animais manifestando LP têm fagocitose com menor intensidade que aquela verificada em leucócitos sangüíneos de animais soronegativos ou infectados, não apresentando LP, e esta intensidade menor ocorre em células que não estavam realizando produção de H_2O_2 .

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1997. 494 p.
- ABREU, J. M. G. **Leucose enzoótica dos bovinos**: prevalência de anticorpos séricos anti-Vírus da Leucose Bovina em animais criados na bacia leiteira de Fortaleza, Estado do Ceará. 1993. 75 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland, 2002. 1616 p.
- ALTREUTHER, G.; LLAMES, L.; NEUENSCHWANDER, S.; LANGHANS, W.; WERLING, D. Morphologic and functional changes in bovine monocytes infected in vitro with the bovine leukaemia virus. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 54, 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, n. 1, 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, n. 1, p. 1-9, 2002.
- BABIOR, B. M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). **The New England Journal of Medicine**, v. 298, n. 12, p. 659-668, 1978a.
- BABIOR, B. M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (second of two parts). **The New England Journal of Medicine**, v. 298, n. 13, p. 721-725, 1978b.
- BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 73, n. 3, p. 599-601, 1984.
- BASS, D. A.; PARCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **Journal of Immunology**, v. 130, n. 4, p. 1910-1917, 1983.
- BAUMGARTENER, L. E.; OLSON, C.; MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Survey for antibodies to leukemia (C-type) virus in cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 166, n. 3, p. 249-251, 1975.
- BENDIXEN, H. J. Bovine enzootic leukosis. **Advances in Veterinary Science**, v. 10, p. 129-204, 1965.
- BEYER, J.; KOLLNER, B.; TEIFKE, J. P.; STARICK, E.; BEIER, D.; REIMANN, I.; GRUNWALD, U.; ZILLER, M. Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 49, n. 6, p. 270-277, 2002.
- BIRGEL JÚNIOR, E. H. **Hemograma de bovinos (*Bos taurus*, Linnaeus, 1758), da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo**. Influência de fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose bovina. 1991. 267 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental

e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

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

BIRGEL, E. H.; BENESI, F. J.; D'ANGELINO, J. L.; HAGIWARA, M. K.; PRADO, M. S. S. Considerações sobre a leucose enzoótica dos bovinos adultos em rebanhos leiteiros criados no Estado de São Paulo. II - Aspectos relacionados à produção. In: SEMANA DE VETERINÁRIA DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA USP, 2., 1983, São Paulo. **Anais...** São Paulo: 1983. p. 71.

BRANDT, R.; KESTON, A. S. Synthesis of diacetyldichlorofluorescein: a stable reagent for fluorometric analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 11, p. 6-9, 1965.

BREDT, D. S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radical Research**, v. 31, n. 6, p. 577-596, 1999.

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

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

BURNY, A.; BRUCK, C.; CLEUTER, Y.; COUEZ, D.; DESCHAMPS, J.; GREGOIRE, D.; GHYSDAEL, J.; KETTMANN, R.; MAMMERICKX, M.; MARBAIX, G. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 3, p. 133-144, 1985.

BURRIDGE, M. J. The zoonotic potential of bovine leukemia virus. **Veterinary Research Communications**, v. 5, n. 2, p. 117-126, 1981.

CAKALA, S. [Clinical aspects and clinico-hematologic differential diagnosis of bovine leukosis]. **Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin**, v. 25, n. 4, p. 753-755, 1971.

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

CARN, V. M. The role of dipterous insects in the mechanical transmission of animal viruses. **British Veterinary Journal**, v. 152, n. 4, p. 377-393, 1996.

CARNEIRO, P. A. M. **Leucose enzoótica dos bovinos**: prevalência de anticorpos séricos anti-Vírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos leiteiros criados na microrregião de Manaus, Estado do Amazonas. 2000. 107 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

CARVALHO, L. **Leucose enzoótica dos bovinos**. Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina em bovinos da raça holandesa preta e branca e zebuínos da raça nelore, criados no pólo regional de Londrina, Estado do Paraná. 1994. 80 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

CHI, J.; VANLEEUEWEN, J. A.; WEERSINK, A.; KEEFE, G. P. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, Mycobacterium

avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 55, n. 2, p. 137-153, 2002.

CHOI, K. Y.; MONKE, D.; STOTT, J. L. Absence of bovine leukosis virus in semen of seropositive bulls. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 5, p. 403-406, 2002.

COCKERELL, G. L.; REYES, R. A. Bovine Leukemia Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (Ed.). **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 614-619.

CORDEIRO, J. L. F.; DESCYHAMPS, F.; MARTINS, E.; MARTINS, V. M. V. Identification and control of bovine enzootic leukosis in a dairy-herd. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 1287-1292, 1994.

CREMER, K. J.; GRUBER, J. Animal-models of retrovirus-associated malignancies. **Veterinary Pathology**, v. 29, n. 6, p. 572-578, 1992.

CUNHA, R. G.; TEIXEIRA, A. C.; DESOUSA, D. M. Antigens of bovine leukosis virus and precipitating antibodies in sera of cattle. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 17, n. 9, p. 1363-1370, 1982.

D'ANGELINO, J. L. **Leucose enzoótica dos bovinos**. Estudo retrospectivo da performance produtiva e reprodutiva de animais infectados e não infectados. 1991. 86 f. Tese (Livro Docência em Patologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 30, n. 1, p. 13-15, 1998a.

D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Productive and reproductive performance in cattle infected with bovine leukosis virus. **Journal of Dairy Research**, v. 65, n. 4, p. 693-695, 1998b.

DEBACQ, C.; ASQUITH, B.; KERKHOF, P.; PORTETELLE, D.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Increased cell proliferation, but not reduced cell death, induces lymphocytosis in bovine leukemia virus-infected sheep. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 15, p. 10048-10053, 2002.

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

DECHATELET, L. R. Initiation of the respiratory burst in human polymorphonuclear neutrophils: a critical review. **Journal of the Reticuloendothelial Society**, v. 24, n. 1, p. 73-91, 1978.

DIGIACOMO, R. F. Horizontal transmission of the bovine leukemia-virus. **Veterinary Medicine**, v. 87, n. 3, p. 263-271, 1992a.

DIGIACOMO, R. F. The epidemiology and control of bovine leukemia-virus infection. **Veterinary Medicine**, v. 87, n. 3, p. 248-257, 1992b.

DIGIACOMO, R. F. Vertical Transmission of the Bovine Leukemia-Virus. **Veterinary Medicine**, v. 87, n. 3, p. 258-262, 1992c.

- DIGIACOMO, R. F.; HOPKINS, S. G. Food animal and poultry retroviruses and human health. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 177-190, 1997.
- DOMENECH, A.; GOYACHE, J.; LLAMES, L.; JESUS PAYA, M.; SUAREZ, G.; GOMEZ-LUCIA, E. In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 1, p. 109-118, 2000.
- DONHAM, K. J.; BURMEISTER, L. F.; VANLIER, S. F.; GREINER, T. C. Relationships of bovine leukemia virus prevalence in dairy herds and density of dairy cattle to human lymphocytic leukemia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 2, p. 235-238, 1987.
- DONOVAN, R. M. Retroviridae. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 411-428.
- ERNSTER, L. Oxygen as an environmental poison. **Chemica Scripta**, v. 26, n. 4, p. 525-534, 1986.
- FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Ed.). **Virus taxonomy VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Academic Press, 2004. 1162 p.
- FERENS, W. A.; COBBOLD, R.; HOVDE, C. J. Intestinal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* bacteria mitigate bovine leukemia virus infection in experimentally infected sheep. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p. 2906-2916, 2006.
- FLAMING, K. P.; FRANK, D. E.; CARPENTER, S.; ROTH, J. A. Longitudinal studies of immune function in cattle experimentally infected with bovine immunodeficiency-like virus and/or bovine leukemia virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 1-2, p. 27-38, 1997.
- FLAMINIO, M. J. B. F.; RUSH, B. R.; DAVIS, E. G.; HENNESSY, K.; SHUMAN, W.; WILKERSON, M. J. Simultaneous flow cytometric analysis of phagocytosis and oxidative burst activity in equine leukocytes. **Veterinary Research Communications**, v. 26, n. 2, p. 85-92, 2002.
- FLENSBURG, J.; WILLEBERG, P. Studies on age specific leukocyte and lymphocyte counts in normal Friesian, Red Danish and Jersey cattle in Denmark. **Nordisk Veterinaraermedicin**, v. 28, n. 3, p. 150-159, 1976.
- FREITAS, T. R.; ROMERO, C. H. Experimental transmission of bovine leukosis virus by leucocytes recovered from the stable fly *Stomoxys calcitrans* L. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. 10, p. 1017-1023, 1991.
- FRIEDMAN, M.; FRIEDLAND, G. W. **As dez maiores descobertas da medicina**. São Paulo: Companhia das Letras, 2000. 363 p.
- FULTON JR., B. E.; PORTELLA, M.; RADKE, K. Dissemination of bovine leukemia virus-infected cells from a newly infected sheep lymph node. **Journal of Virology**, v. 80, n. 16, p. 7873-7884, 2006.
- GALLO, R. C.; SLISKI, A.; WONG-STAAAL, F. Origin of human T-cell leukaemia-lymphoma virus. **Lancet**, v. 2, n. 8356, p. 962-963, 1983.
- GARCIA, M. **Avaliação da resposta imunitária em bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose**. 1992. 71 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

GARCIA, M. **Avaliação do leucograma de fêmeas bovinas da raça holandesa branca e preta naturalmente infectadas pelo vírus da leucose bovina**. 1989. 67 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

GATEI, M. H.; LAVIN, M. F.; DANIEL, R. C. Serum immunoglobulin concentrations in cattle naturally infected with bovine leukemia virus. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B**, v. 37, n. 8, p. 575-580, 1990.

GODDEERIS, B. Immunology of Cattle. In: PASTORET, P.; GRIEBEL, P. BAZIN, H.; GOVARERTS, A. (Ed.). **Handbook of vertebrate immunology**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 439-484.

GONYE, S.; HORVATH, Z. [Experiences with automatic blood cell count devices with special reference to the hematologic examination of bovine leukosis]. **Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin**, v. 25, n. 4, p. 765-768, 1971.

GORDON, R. **A assustadora história da medicina**. São Paulo: Ediouro, 2002. 432 p.

GUTIERREZ, S. E.; DOLCINI, G. L.; ARROYO, G. H.; RODRIGUEZ DUBRA, C.; FERRER, J. F.; ESTEBAN, E. N. Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 10, p. 1571-1577, 2001.

HAMMON, D. S.; EVJEN, I. M.; DHIMAN, T. R.; GOFF, J. P.; WALTERS, J. L. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, n. (1-2), p. 21-29. 2006.

HARVEY, J. W. **Atlas of veterinary hematology**. blood and bone marrow of domestic animals. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. 228 p.

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

HEENEY, J. L.; VALLI, P. J.; JACOBS, R. M.; VALLI, V. E. Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. **Laboratory Investigation**, v. 66, n. 5, p. 608-617, 1992.

HEENEY, J. L.; VALLI, V. E.; MONTESANTI, J. Alterations in humoral immune response to bovine leukaemia virus antigens in cattle with lymphoma. **Journal of General Virology**, v. 69, n. 3, p. 659-666, 1988.

HIRABAYASHI, Y.; TANIUCHI, S.; KOBAYASHI, Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 82, n. 2, p. 253-259, 1985.

HODGSON, J. C.; WATKINS, C. A.; BAYNE, C. W. Contribution of respiratory burst activity to innate immune function and the effects of disease status and agent on chemiluminescence responses by ruminant phagocytes in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 1-2, p. 12-23, 2006.

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

- JACOBS, R. M.; SMITH, H. E.; GREGORY, B.; VALLI, V. E.; WHETSTONE, C. A. Detection of multiple retroviral infections in cattle and cross-reactivity of bovine immunodeficiency-like virus and human immunodeficiency virus type 1 proteins using bovine and human sera in a western blot assay. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 4, p. 353-359, 1992.
- JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febinger, 1986. 1221 p.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. 6. ed. New York: Garland, 2004. 800 p.
- JOHNSON, J. M.; HARROD, R.; FRANCHINI, G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 3, p. 135-147, 2001.
- JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine leukemia-virus. 3. zoonotic potential, molecular epidemiology, and an animal-model. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 13, n. 10, p. 1631-1640, 1991a.
- JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine leukemia-virus. 4. economic-impact and control measures. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 13, n. 11, p. 1727-1735, 1991b.
- KABEYA, H.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 7, p. 703-708, 2001.
- KABEYA, H.; OHASHI, K.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Characterization of immune responses caused by bovine leukemia virus envelope peptides in sheep. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 5, p. 475-480, 1999.
- KACZMARCZYK, E.; BOJAROJC-NOSOWICZ, B.; FIEDOROWICZ, A. Leukocyte acid phosphatase and metabolic efficiency of phagocytes in the first lactation trimester of cows from a leukaemic herd. **Journal of Applied Genetics**, v. 46, n. 1, p. 59-67, 2005.
- KALE, M.; YAVRU, S.; YAPKIC, O. Evaluation of serological and haematological tests for the diagnosis of bovine leucosis virus infection. **Indian Veterinary Journal**, v. 82, n. 8, p. 841-843, 2005.
- KAMPEM, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LARSEN, S.; ROTH, J. A.; FRANK, D. E.; LUND, A. Repeatability of flow cytometric and classical measurement of phagocytosis and respiratory burst in bovine polymorphonuclear leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, n. 1-2, p. 105-114, 2004a.
- KAMPEM, A. H.; TOLLERSRUD, T.; LUND, A. Flow cytometric measurement of neutrophil respiratory burst in whole bovine blood using live *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunological Methods**, v. 289, n. 1-2, p. 47-55, 2004b.
- 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, n. 1-2, p. 39-51, 1997a.
- 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, n. 3-4, p. 271-283, 1997b.

- KETTMANN, R.; MEUNIER-ROTIVAL, M.; CORTADAS, J.; CUNY, G.; GHYSDAEL, J.; MAMMERICKX, M.; BURNY, A.; BERNARDI, G. Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 10, p. 4822-4826, 1979.
- KIM, Y. M.; LIM, J. M.; KIM, B. C.; HAN, S. Cu,Zn-superoxide dismutase is an intracellular catalyst for the H(2)O(2)-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein. **Molecules and Cells**, v. 21, n. 1, p. 161-165, 2006.
- KLINTEVALL, K.; FUXLER, L.; FOSSUM, C. Bovine leukemia virus: early reflections in blood after an experimental infection of calves. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 119-130, 1997.
- KOHARA, J.; KONNAI, S.; ONUMA, M. Experimental transmission of Bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. **The Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 1, p. 25-30, 2006.
- KONNAI, S.; USUI, T.; IKEDA, M.; KOHARA, J.; HIRATA, T.; OKADA, K.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Imbalance of tumor necrosis factor receptors during progression in bovine leukemia virus infection. **Virology**, v. 339, n. 2, p. 239-248, 2005.
- KONNAI, S.; USUI, T.; IKEDA, M.; KOHARA, J.; HIRATA, T.; OKADA, K.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Tumor necrosis factor- α up-regulation in spontaneously proliferating cells derived from bovine leukemia virus-infected cattle. **Archives of Virology**, v. 151, n. 2, p. 347-360, 2006.
- KOOY, N. W.; ROYALL, J. A.; ISCHIROPOULOS, H. Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxynitrite. **Free Radical Research**, v. 27, n. 3, p. 245-254, 1997.
- KRAMER, J. W. Normal Hematology of Cattle, Sheep, and Goats. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (Ed.). **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 1075-1084.
- KUPSCH, H. R.; MIETH, K. [Comparative studies of various leukocyte and lymphocyte counting methods and their usefulness in the diagnosis of bovine leukosis]. **Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin**, v. 24, n. 6, p. 1277-1282, 1970.
- KVARNFORS, E.; HENRICSON, B.; HUGOSON, G. A statistical study on farm and village level on the possible relations between human leukaemia and bovine leukosis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 16, n. 2, p. 163-169, 1975.
- LALOV, C. [Criteria in the evaluation of blood picture for the diagnosis of bovine leukosis]. **Archiv für Experimentelle Veterinärmedizin**, v. 25, n. 4, p. 741-745, 1971.
- LASSAUZET, M. L.; THURMOND, M. C.; JOHNSON, W. O.; STEVENS, F.; PICANSO, J. P. Effect of brucellosis vaccination and dehorning on transmission of bovine leukemia virus in heifers on a California dairy. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 1, p. 184-189, 1990.
- LEE, J.; KIM, Y.; KANG, C. S.; CHO, D. H.; SHIN, D. H.; YUM, Y. N.; OH, J. H.; KIM, S. H.; HWANG, M. S.; LIM, C. J.; YANG, K. H.; HAN, K. Investigation of the bovine leukemia virus proviral DNA in human leukemias and lung cancers in Korea. **Journal of Korean Medical Science**, v. 20, n. 4, p. 603-606, 2005.
- LEVKUT, M.; PONTI, W.; LEVKUTOVA, M.; ROCCHI, M.; POLI, G.; DELILIERIS, G. L.; QUIRICI, N.; LENG, L. Immunoanalysis of IgG and IgM molecules on the surface of BLV infected cattle lymphocytes. **Comparative Haematology International**, v. 7, n. 3, p. 152-156, 1997.

- LORENZ, R. J.; STRAUB, O. C. The epidemiology of enzootic bovine leukosis. In: BURNY, A.; MAMMERICKX, M. (Ed.). **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus**. Boston: Martinus Nijhoff, 1987. p. 51-68.
- LUCAS, M. H.; ROBERTS, D. H.; BANKS, J. Shedding of bovine leukosis virus in nasal secretions of infected animals. **The Veterinary Record**, v. 132, n. 11, p. 276-278, 1993.
- LUNDBERG, P.; SPLITTER, G. A. gammadelta(+) T-Lp6phocyte 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.
- MARUYAMA, K.; FUKUSHIMA, T.; MOCHIZUKI, S. Cross-reactive antibodies to BLV and HTLV in bovine and human hosts with retrovirus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 22, n. 3, p. 265-273, 1989.
- MASSOCO, C.; PALERMO NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, n. 1-2, p. 11-19, 2003.
- MATEO, L.; GARDNER, J.; SUHRBIER, A. Delayed emergence of bovine leukemia virus after vaccination with a protective cytotoxic T cell-based vaccine. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 17, n. 15, p. 1447-1453, 2001.
- MATTHAEUS, W.; KAADEN, O. R.; FRENZEL, B.; SCHLOTTERER, E. Identification and behavior of the precipitating BLV antibodies in sera of leukotic cattle. **International Journal of Cancer**, v. 22, n. 2, p. 166-173, 1978.
- MCCOY JR, J. P. Basic principles in clinical flow cytometry. In: KEREN, D. F.; HANSON, C. A.; HURTUBISE, P. E. (Ed.). **Flow cytometry and clinical diagnosis**. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1994. p. 26-55.
- MEIROM, R.; MOSS, S.; BRENNER, J.; HELLER, D.; TRAININ, Z. Levels and role of cytokines in bovine leukemia virus (BLV) infection. **Leukemia**, v. 11, n. 3, p. 219-220, 1997.
- MELO, L. E. H. **Avaliação da intercorrência entre leucose enzoótica, tuberculose e leptospirose dos bovinos em rebanhos produtores de leite C do Estado de São Paulo**. 1999. 127 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- MELO, L. E. H. **Leucose enzoótica dos bovinos: Prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no agreste meridional do estado de Pernambuco**. 1991. 124 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bovina) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.
- MILLER, J. A.; MILLER, L. D.; OLSON, C.; GILLETTE, K. G. Virus-like Particles in Phytohemagglutinin-stimulated Lymphocyte Cultures with Reference to Bovine Lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1297-1305, 1969.
- MILLER, J. M. Animal model of human disease. Malignant lymphoma. **The American Journal of Pathology**, v. 75, n. 2, p. 417-420, 1974.
- MIRSKY, M. L.; OLMSTEAD, C. A.; DA, Y.; LEWIN, H. A. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. **Journal of Virology**, v. 70, n. 4, p. 2178-2183, 1996.
- MOLLOY, J. B.; DIMMOCK, C. K.; EAVES, F. W.; BRUYERES, A. G.; COWLEY, J. A.; WARD, W. H. Control of bovine leukaemia virus transmission by selective culling of

infected cattle on the basis of viral antigen expression in lymphocyte cultures. **Veterinary Microbiology**, v. 39, n. 3-4, p. 323-333, 1994.

MONTI, G. E.; FRANKENA, K.; DE JONG, M. C. Evaluation of natural transmission of bovine leukaemia virus within dairy herds of Argentina. **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 3, p. 1-10, 2006.

MONTI, G. E.; FRANKENA, K.; ENGEL, B.; BUIST, W.; TARABLA, H. D.; DE JONG, M. C. Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 5, p. 451-457, 2005.

MORRIS, S. D.; BRYSON, N. R.; DE WAAL, D. T.; MATTHEE, O.; DU PREEZ, E. R.; VAN VUUREN, M.; KADISH, E. S. The possible role of two common three-host ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma hebraeum*, in the transmission of bovine leukosis virus. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 67, n. 3, p. 148-150, 1996.

MOTTON, D. D.; BUEHRING, G. C. Bovine leukemia virus alters growth properties and casein synthesis in mammary epithelial cells. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 9, p. 2826-2838, 2003.

MURAKAMI, K.; SENTSU, H.; INOSHIMA, Y.; INUMARU, S. Increase in gammadelta T cells in the blood of cattle persistently infected with bovine leukemia virus following administration of recombinant bovine IFN-gamma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 101, n. (1-2), p. 61-71, 2004.

NAGY, D. W.; TYLER, J. W.; KLEIBOEKER, S. B. Enhanced periparturient transmission of bovine leukosis virus in colostrum-deprived calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 724-725, 2006.

NAGY, D. W.; TYLER, J. W.; KLEIBOEKER, S. B.; STOKER, A. Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukosis virus in dairy cattle. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 7, p. 983-985, 2003.

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

OHISHI, K.; IKAWA, Y. T cell-mediated destruction of bovine leukemia virus-infected peripheral lymphocytes by bovine leukemia virus env-vaccinia recombinant vaccine. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 12, n. 5, p. 393-398, 1996.

OIE. Health Standards. Terrestrial Animal Health Code 2003. **Enzootic bovine leukosis**. [s.l.: s.n., 2003]. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 10 ago. 2006.

OLSON, C.; DRISCOLL, D. M. Association of human beings and bovine leukosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 7, p. 872-872, 1978a.

OLSON, C.; DRISCOLL, D. M. Bovine leukosis - investigation of risk for man. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 11, p. 1470-1472, 1978b.

OLSON, C.; HOSS, H. E.; MILLER, J. M.; BAUMGARTENER, L. E. Evidence of bovine C-type (leukemia) virus in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 163, n. 4, p. 355-357, 1973.

OLSON, C.; MILLER, J. M. History and terminology of enzootic bovine leukosis. In: BURNY, A.; MAMMERICKX, M. (Ed.). **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus**. Boston: Martinus Nijhoff, 1987. p. 3-11.

ONUMA, M.; YASUTOMI, Y.; YAMAMOTO, M.; WATARAI, S.; YASUDA, T.; KAWAKAMI, Y. Antitumor effect of adriamycin entrapped in liposomes conjugated with anti-bovine tumor antigen monoclonal antibody in leukemic cows. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B**, v. 36, n. 2, p. 139-147, 1989.

OTT, S. L.; JOHNSON, R.; WELLS, S. J. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 61, n. 4, p. 249-262, 2003.

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

PELZER, K. D. Economics of bovine leukemia virus infection. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 129-141, 1997.

POLLARI, F. L.; HOPKINS, S. G.; DIGIACOMO, R. F.; EVERMANN, J. F. Periparturient transmission of bovine leukosis virus in dairy cattle. **The Veterinary Record**, v. 132, n. 8, p. 190-191, 1993.

PYEON, D.; O'REILLY, K. L.; SPLITTER, G. A. Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing or persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5706-5710, 1996.

PYEON, D.; SPLITTER, G. A. Interleukin-12 p40 mRNA expression in bovine leukemia virus-infected animals: increase in alymphocytosis but decrease in persistent lymphocytosis. **Journal of Virology**, v. 72, n. 8, p. 6917-6921, 1998.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

RAO, K. M.; PADMANABHAN, J.; KILBY, D. L.; COHEN, H. J.; CURRIE, M. S.; WEINBERG, J. B. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 51, n. 5, p. 496-500, 1992.

RHODES, J. K.; PELZER, K. D.; JOHNSON, Y. J. Economic implications of bovine leukemia virus infection in mid-Atlantic dairy herds. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 3, p. 346-352, 2003a.

RHODES, J. K.; PELZER, K. D.; JOHNSON, Y. J.; RUSSEK-COHEN, E. Comparison of culling rates among dairy cows grouped on the basis of serologic status for bovine leukemia virus. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 2, p. 229-231, 2003b.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. K. **Immunobiology**. London: Gower Medical, 1985. p. 1.1-2.15.

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

SAGATA, N.; IKAWA, Y. BLV and HTLV-I: their unique genomic structures and evolutionary relationship. **Princess Takamatsu Symposia**, v. 15, p. 229-240, 1984.

- SAGATA, N.; YASUNAGA, T.; TSUZUKU-KAWAMURA, J.; OHISHI, K.; OGAWA, Y.; IKAWA, Y. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 3, p. 677-681, 1985.
- SCHWARTZ, I.; BENSAD, A.; POLACK, B.; PERRIN, B.; BERTHELEMY, M.; LEVY, D. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. **Journal of Virology**, v. 68, n. 7, p. 4589-4596, 1994.
- SCHWARTZ, I.; LEVY, D. Pathobiology of bovine leukemia virus. **The Veterinary Research**, v. 25, n. 6, p. 521-536, 1994.
- SEIKI, M.; HATTORI, S.; YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: molecular cloning of the provirus DNA and the unique terminal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 22, p. 6899-6902, 1982.
- SHEPHERD, V. L. The role of the respiratory burst of phagocytes in host defense. **Seminars in Respiratory Infections**, v. 1, n. 2, p. 99-106, 1986.
- SHIMIZU, A.; SHIMIZU, N.; TANAKA, A.; JINNO-OUE, A.; ROY, B. B.; SHINAGAWA, M.; ISHIKAWA, O.; HOSHINO, H. Human T-cell leukaemia virus type I is highly sensitive to UV-C light. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 8, p. 2397-406, 2004.
- SI, Z.; VANDEGRAAFF, N.; O'HUIGIN, C.; SONG, B.; YUAN, W.; XU, C.; PERRON, M.; LI, X.; MARASCO, W. A.; ENGELMAN, A.; DEAN, M.; SODROSKI, J. Evolution of a cytoplasmic tripartite motif (TRIM) protein in cows that restricts retroviral infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 19, p. 7454-7459, 2006.
- SIEFKES, D. The origin of HIV-1, the AIDS virus. **Medical Hypotheses**, v. 41, n. 4, p. 289-299, 1993.
- SILVA, S. V. **Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos anti-Vírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos cruzados – holandês/zebu e em animais da raça Pé-duro, criados no Estado do Piauí**. 2001. 176 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- SILVEIRA, L. R. Considerações críticas e metodológicas na determinação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células musculares durante contrações. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 812-22, 2004.
- SILVEIRA, L. R. **Determinação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico através de sondas fluorescentes *in vitro* utilizando culturas de células musculares e músculos isolados e sua aplicação *in vivo* com a técnica de microdiálise**. 2003. 93 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- SIMÕES, S. S. D. **Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos anti-Vírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos leiteiros do Estado da Paraíba**. 1998. 118 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- SMITS, E.; BURVENICH, C.; HEYNEMAN, R. Simultaneous flow cytometric measurement of phagocytotic and oxidative burst activity of polymorphonuclear leukocytes in whole bovine blood. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 3-4, p. 259-69, 1997.

SOH, N. Recent advances in fluorescent probes for the detection of reactive oxygen species. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 3, p. 532-543, 2006.

SZEJDA, P.; PARCE, J. W.; SEEDS, M. S.; BASS, D. A. Flow cytometric quantitation of oxidative product formation by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. **Journal of Immunology**, v. 133, n. 6, p. 3303-3307, 1984.

TAVORA, J. P. F. **Hemograma de bovinos das raças Gir, Girolando e Holandesa criados no Estado de São Paulo**: estabelecimento dos valores de referência e avaliação das influências de fatores de variabilidade raciais, etários e sexuais. 1997. 163 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

TAVORA, J. P. F. **Prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em rebanhos leiteiros criados na região do pólo Itabuna, Estado da Bahia**. 1990. 106 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

TEUTSCH, M. R.; LEWIN, H. A. Aberrant expression of immunoglobulin mRNA in bovine leukemia virus-infected cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 53, n. 1-2, p. 87-94, 1996.

THOMAS, E. L.; LEHRER, R. I.; REST, R. F. Human neutrophil antimicrobial activity. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p. 450-456, 1988.

THURMOND, M. C. Calf management to control bovine leukemia virus infection. **The Cornell Veterinarian**, v. 81, n. 3, p. 227-231, 1991.

THURMOND, M. C. Economics of enzootic bovine leukosis. In: BURNY, A.; MAMMERICKX, M. (Ed.). **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus**. Boston: Martinus Nijhoff, 1987. p. 71-83.

THURMOND, M. C.; LAPUZ, G. R.; FARVER, T. B.; MANDAC, G. C. Retrospective study of four years of carcass condemnation rates for malignant lymphoma in California cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 6, p. 1387-1391, 1985.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. 532 p.

TRAININ, Z.; BRENNER, J.; MEIROM, R.; UNGAR-WARON, H. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 54, n. 1-4, p. 293-302, 1996.

UJVARI, S. C. **A história e suas epidemias**. A convivência do homem com os microorganismos. Rio de Janeiro: SENAC Rio, 2003. 328 p.

UNGAR-WARON, H.; PAZ, R.; BRENNER, J.; YAKOBSON, B.; PARTOSH, N.; TRAININ, Z. Experimental infection of calves with bovine leukemia virus (BLV): an applicable model of a retroviral infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, n. 2, p. 195-201, 1999.

USUI, T.; KONNAI, S.; TAJIMA, S.; WATARAI, S.; AIDA, Y.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 11, p. 1201-1205, 2003.

VALIKHOV, A. F. [Serum precipitating antibodies to oncornavirus type C]. **Veterinariia**, n. 1, p. 44-46, 1976.

- VAN OOSTVELDT, K.; PAAPE, M. J.; DOSOGNE, H.; BURVENICH, C. Effect of apoptosis on phagocytosis, respiratory burst and CD18 adhesion receptor expression of bovine neutrophils. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, n. 1, p. 37-50, 2002.
- VERHOEF, J.; WALDVOGEL, F. A. Testing phagocytic cell function. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 379-391, 1985.
- VON BEUST, B. R.; BROWN, W. C.; ESTES, D. M.; ZARLENGA, D. S.; MCELWAIN, T. F.; PALMER, G. H. Development and in vitro characterization of recombinant vaccinia viruses expressing bovine leukemia virus gp51 in combination with bovine IL4 or IL12. **Vaccine**, v. 17, n. 4, p. 384-395, 1999.
- VOWELLS, S. J.; SEKHSARIA, S.; MALECH, H. L.; SHALIT, M.; FLEISHER, T. A. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. **Journal of Immunological Methods**, v. 178, n. 1, p. 89-97, 1995.
- WALRAND, S.; VALEIX, S.; RODRIGUEZ, C.; LIGOT, P.; CHASSAGNE, J.; VASSON, M. P. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. **Clinica Chimica Acta**, v. 331, n. 1-2, p. 103-110, 2003.
- WANG, C. T.; ONUMA, M. Attempt to eradicate bovine leukemia virus-infected cattle from herds. **The Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 2-3, p. 105-111, 1992.
- WATARAI, T. S.; LEE, J. T.; ONUMA, M.; OCHIAI, K.; KAKIDANI, H.; YASUDA, T. In vivo antitumor effect of cationic liposomes containing diphtheria toxin A-chain gene on cells infected with bovine leukemia virus. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 7, p. 617-619, 1997.
- WATSON, G. L.; SLOCOMBE, R. F.; ROBINSON, N. E.; SLEIGHT, S. D. Definition of chemiluminescence and superoxide production responses of bovine neutrophils to selected soluble and particulate stimulants, and comparisons with the responses to *Pasteurella haemolytica*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 8, p. 1045-1054, 1995.
- WELCH, H.; MAURAN, C.; MARIDONNEAU-PARINI, I. I. Nonreceptor protein-tyrosine kinases in neutrophil activation. **Methods**, v. 9, n. 3, p. 607-618, 1996.
- WELLMAN, M. L. Lymphoproliferative disorders of large granular lymphocytes. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (Ed.). **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 641-647.
- WERLING, D.; HOWARD, C. J.; NIEDERER, E.; STRAUB, O. C.; SAALMULLER, A.; LANGHANS, W. Analysis of the phenotype and phagocytic activity of monocytes/macrophages from cattle infected with the bovine leukaemia virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 62, n. 3, p. 185-195, 1998.
- WERLING, D.; SILEGHEM, M.; LUTZ, H.; LANGHANS, W. Effect of bovine leukemia virus infection on bovine peripheral blood monocyte responsiveness to lipopolysaccharide stimulation in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, n. 1-2, p. 77-88, 1995.
- WINKLER, G. C. Pulmonary intravascular macrophages in domestic animal species: review of structural and functional properties. **The American Journal of Anatomy**, v. 181, p. 217-234, 1988.
- WITTMANN, W.; SEILS, H. [Diagnosis and control of bovine enzootic leucosis. 2. Development of the total lymphocyte count in spontaneous and experimentally induced leucosis]. **Archiv fur Experimentelle Veterinarmedizin**, v. 23, n. 4, p. 775-782, 1969.

WRATHALL, A. E.; SIMMONS, H. A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 247-274, 2006.

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

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiological Reviews**, v. 74, n. 1, p. 139-162, 1994.

APÊNDICE

¹ FSC-H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 41 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soronegativa para Leucose Enzoótica Bovina, em ensaio sem prévio estímulo *in vitro* – São Paulo – 2007

¹ FSC-H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 42 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soronegativa para Leucose Enzoótica Bovina, em ensaio após adição, *in vitro*, de PMA – São Paulo – 2007

¹ FSC-H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 43 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soronegativa para Leucose Enzoótica Bovina, em ensaio após adição, *in vitro*, de LPS – São Paulo – 2007

¹ FSC-H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 44 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soronegativa para Leucose Enzoótica Bovina, em ensaio após fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus* conjugado ao iodeto de propídio – São Paulo – 2007

¹ FSC-H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 45 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, alinfocitótica, em ensaio sem prévio estímulo *in vitro* – São Paulo – 2007

¹ FSC-H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 46 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, alinfocitótica, em ensaio após adição, *in vitro*, de PMA – São Paulo – 2007

¹ FSC-H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 47 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, alinfocitótica, em ensaio após adição, *in vitro*, de LPS – São Paulo – 2007

¹ FSC-H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 48 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, alinfocitótica, em ensaio após fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus* conjugado ao iodeto de propídio – São Paulo – 2007

¹ FSC-H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 49 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente, em ensaio sem prévio estímulo *in vitro* – São Paulo – 2007

¹ FSC-H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 50 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente, em ensaio após adição, *in vitro*, de PMA – São Paulo – 2007

¹ FSC-H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 51 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente, em ensaio após adição, *in vitro*, de LPS – São Paulo – 2007

¹ FSC-H: *forward scatter characteristic*; SSC-H: *side scatter characteristic* (em valores arbitrários).

Figura 52 – Citograma de leucócitos sangüíneos de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente, em ensaio após fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus* conjugado ao iodeto de propídio – São Paulo – 2007

¹ FL1-H: log da intensidade de fluorescência do DCF; FL2-H: log da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (em valores arbitrários). São consideradas células produzindo H_2O_2 e/ou fagocitando aquelas com valores superiores a 10.

Figura 53 – Dotplot da produção de H_2O_2 (FL1), em função da fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus* (FL2), por leucócitos sangüíneos, em amostra de vaca soronegativa para Leucose Enzoótica Bovina – São Paulo – 2007

¹ FL1-H: log da intensidade de fluorescência do DCF; FL2-H: log da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (em valores arbitrários). São consideradas células produzindo H_2O_2 e/ou fagocitando aquelas com valores superiores a 10.

Figura 54 – Dotplot da produção de H_2O_2 (FL1), em função da fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus* (FL2), por leucócitos sangüíneos, em amostra de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, alinfocitótica – São Paulo – 2007

¹ FL1-H: log da intensidade de fluorescência do DCF; FL2-H: log da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (em valores arbitrários). São consideradas células produzindo H_2O_2 e/ou fagocitando aquelas com valores superiores a 10.

Figura 55 – Dotplot da produção de H_2O_2 (FL1), em função da fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus* (FL2), por leucócitos sangüíneos, em amostra de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente – São Paulo – 2007

¹ FL2-H: log da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (em valores arbitrários). São consideradas células fagocitando aquelas com valores superiores a 10.

Figura 56 – Histograma da quantidade de leucócitos sangüíneos realizando fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus* (FL2), em amostra de vaca soronegativa para Leucose Enzoótica Bovina – São Paulo – 2007

¹ FL2-H: log da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (em valores arbitrários). São consideradas células fagocitando aquelas com valores superiores a 10.

Figura 57 – Histograma da quantidade de leucócitos sangüíneos realizando fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus* (FL2), em amostra de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, alinfocitótica – São Paulo – 2007

¹ FL2-H: log da intensidade de fluorescência do iodeto de propídio (em valores arbitrários). São consideradas células fagocitando aquelas com valores superiores a 10.

Figura 58 – Histograma da quantidade de leucócitos sangüíneos realizando fagocitose *in vitro* de *Staphylococcus aureus* (FL2), em amostra de vaca soropositiva para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente – São Paulo – 2007

De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre
começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos
antes de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho
novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...

Fernando Pessoa