

# TURNOVER DE LINFÓCITOS EM BOVINOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA APRESENTANDO LINFOCITOSE PERSISTENTE

AZEDO, M.R.<sup>1\*</sup>; BLAGITZ, M.G.<sup>1</sup>; SOUZA, F.N.<sup>1</sup>; SPINOLA, T.R.<sup>1</sup>; SCHALCH, U.M.<sup>1</sup>; DELLA LIBERA, A.M.M.P.<sup>1</sup>

## INTRODUÇÃO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB), caracterizada como uma enfermidade neoplásica infecto-contagiosa, pluri-sintomática, de evolução caracteristicamente crônica, afeta, particularmente, a linhagem celular linfóide destes animais (SCHWARTZ; LEVY, 1994). Seu agente etiológico, o Vírus da Leucose Bovina (VLB) encontra-se, atualmente, assim como os vírus linfotrópicos de células T de humanos (HTLV), classificado no gênero *Deltaretrovirus* da família *Retroviridae* (FAUQUET et al., 2004). Compartilhando arranjo estrutural e genético (SAGATA et al., 1985), ambos desenvolvem doença crônica e proliferação das células-alvo envolvendo células e mediadores imunológicos (JOHNSON et al., 2001).

Assim, o VLB tem sido sugerido como um profícuo modelo animal para o estudo da influência dos vírus oncogênicos linfotrópicos na resposta imunológica do hospedeiro (UNGAR-WARON et al., 1999). Para tal, estudos encerram, principalmente, a infecção experimental de ovinos (DEBACQ et al., 2002), pela facilidade de manejo e pelo fato de que a enfermidade, nesta espécie, provoca alterações mais precoces e mais freqüentes (FLORINS et al., 2008), assim como bovinos infectados. Pesquisas envolvendo ovinos infectados auxiliam no esclarecimento da patogenia retroviral, no entanto, alguns resultados verificados podem ser diversos daqueles porventura observados na infecção natural em bovinos.

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, com variadas taxas de incidência (LORENZ; STRAUB, 1987). Entretanto, na média, acompanham a incidência há décadas 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).

Na pecuária bovina atual, sua transmissão 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 (HOPKINS; DIGIACOMO, 1997).

Parodi (1987) observou que, na infecção pelo VLB, o animal pode apresentar-se com sorodiagnóstico positivo, com ou sem a presença de linfocitose persistente (LP), caracterizada como um aumento na contagem absoluta de linfócitos de três ou mais desvios-padrão, que persiste por mais de três meses, e encontrada em cerca de 30 a 70% dos bovinos infectados. Podem, ainda, em cerca de 0,1 a 10% dos animais infectados, desenvolver linfossarcomas, comumente em linfonodos, baço, coração, útero, abomaso, fígado e/ou rins, tendo previamente apresentado ou não LP.

Os sintomas decorrentes da infecção 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

---

<sup>1</sup> Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, CEP.: 05508-000, São Paulo, SP.

(PARODI, 1987). São relatados, também, abortamento, partos laboriosos, paresias ou paraplegias e exoftalmia (BURNY et al., 1985).

Deste modo, perdas econômicas diretas 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 (D'ANGELINO et al., 1998). Perdas indiretas são decorrentes da restrição no comércio de animais ou de seus produtos (PELZER, 1997).

Nada obstante, a patogenia exata da infecção causada pelos deltaretrovírus ainda não foi completamente elucidada. Embora as principais células infectadas pelo HTLV sejam os linfócitos T (OHSHIMA, 2007), 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).

Na manifestação alinfocitótica da LEB, há um balanço entre a infecção de novos linfócitos B e a eliminação de células que expressam antígenos virais. No entanto, a seqüência 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. 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).

## **OBJETIVO**

O presente estudo teve como objetivo avaliar a proliferação e a morte celular de linfócitos obtidos de bovinos naturalmente infectados pelo VLB, frente ao desafio com antígeno heterólogo fornecido por vacinação contra o vírus da febre aftosa, em diferentes fases da infecção.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Para a seleção dos animais, foram coletadas amostras sangüíneas de 274 fêmeas bovinas da raça Holandês Preto e Branco, oriundas de rebanhos localizados no Estado de São Paulo, com idade superior a 24 meses. Estes animais apresentavam bom estado nutricional, não haviam sido submetidos a tratamento com glicocorticóides nos últimos 30 dias, assim como não se encontravam em fase puerperal.

O número total de leucócitos por  $\mu\text{L}$  de sangue foi mensurado através de contagem automática (ABC Vet<sup>®</sup> – ABX<sup>™</sup>) e a contagem diferencial foi feita por meio de esfregaços sangüíneos corados. Foram considerados, como referência para as contagens leucocitárias dos animais, os dados obtidos por Távora (1998). Além disso, a confirmação da linfocitose persistente foi feita com dois leucogramas consecutivos a intervalos de 90 dias. O soro, obtido após centrifugação por 10 minutos a 3.000 rpm, foi conservado à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização do sorodiagnóstico para LEB.

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, 2008). Para tanto, foi utilizado o antígeno glicoprotéico (gp51) comercial, extraído do envelope do VLB. Foram, também, utilizados Kits comerciais de ELISA.

Os animais foram divididos em grupos, segundo o sorodiagnóstico, e subdivididos, conforme os resultados dos leucogramas, em animais com sorodiagnóstico negativo (grupo SN; n = 10), com sorodiagnóstico positivo alinfocitóticos (grupo AL; n = 10) e animais com sorodiagnóstico positivo apresentando LP (grupo PL; n = 10).

Os ensaios de proliferação celular induzido por Concanavalina-A (Con-A) e por

lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli*, assim como os de morte celular por apoptose, utilizando-se de Anexina-V e Iodeto de Propídio (PI), foram conduzidos segundo técnicas empregadas por Orlik e Splitter (1996) e Debacq et al. (2002), com modificações.

Para tal, foram coletadas, de cada animal, duas amostras em tubo siliconizado com heparina. As amostras foram coletadas em 8 tempos, o primeiro antes do desafio antigênico através de vacinação contra o vírus da febre aftosa, utilizando-se de vacina oleosa comercial, e depois, uma vez por semana, durante sete semanas, segundo metodologia empregada por Garcia (1992).

Conforme indicado por Callegari-Jacques (2003), para a avaliação das diferenças entre as médias dos resultados obtidos, de acordo, respectivamente, com a ocorrência ou não de homoscedasticidade, 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  $p=0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na triagem dos grupos experimentais, 133 (48,54%) foram diagnosticadas, por IDAG, como positivas para LEB. Por sua vez, utilizando-se do teste ELISA, 231 amostras foram diagnosticadas como positivas (84,31%). Para a formação dos grupos experimentais, foram considerados positivos no sorodiagnóstico para a LEB, os 133 animais diagnosticados como sororeagentes no teste IDAG (de maior especificidade), e foram considerados negativos, os 43 animais apresentando diagnóstico negativo no teste ELISA (de maior sensibilidade).

A incidência verificada à IDAG é superior àquela verificada por Olson et al. (1973), em rebanhos leiteiros na Alemanha, mas se encontram dentro dos limites observados 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).

Somando-se três desvios padrão à contagem absoluta de linfócitos de cada animal avaliado, verificou-se que, dentre os 133 animais considerados positivos, 27 (20,30% dos animais positivos e 9,85% do total) apresentavam linfocitose de tal monta.

Observou-se que a incidência de animais apresentando LP verificada 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.

Konnai et al. (2006) demonstraram que as células mononucleares de sangue periférico obtidas de bovinos infectados apresentam proliferação espontânea *in vitro* dependente de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e que estas expressam maior quantidade de RNAm do TNF- $\alpha$  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- $\alpha$ , 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 bovinos com LP era reduzida em relação à dos animais alinfocitóticos, e que a proliferação destas células também se encontrava reduzida, porém em menor grau. Anteriormente, os autores haviam verificado que, em ovinos infectados experimentalmente, um aumento na proliferação de linfócitos B, mas não uma diminuição do seu índice de apoptose, induz à manifestação da LP nesses animais (DEBACQ et al., 2002).

Neste estudo, os índices de proliferação de linfócitos obtidos dos bovinos

manifestando LP, sem estímulo *in vitro* (Figura 1), após estímulo *in vitro* com a adição de Con-A (Figura 2), ou com a adição de LPS (Figura 3), foram menores que aqueles verificados em linfócitos obtidos dos animais pertencentes aos demais grupos experimentais, quatro dias antes ( $p < 0,001$ ) e 31 ( $p = 0,012$ ) e 38 ( $p = 0,028$ ) dias após o desafio antigênico. Por outro lado, não houve diferença três, dez, 17, 24 e 45 dias após o desafio.

No entanto, as porcentagens de células obtidas de animais manifestando LP, em processo de apoptose (Figura 4), foram, a todo tempo, menores que aquelas verificadas em linfócitos obtidos dos animais pertencentes aos demais grupos experimentais ( $p < 0,001$ ).

Os resultados divergentes observados no presente estudo podem ser explicados pelas verificações pontuais realizadas pelos demais autores e pela possibilidade de potenciais desafios antigênicos a que poderiam estar sendo submetidos os animais então avaliados.

### CONCLUSÃO

Os resultados observados no presente estudo demonstram que bovinos naturalmente infectados pelo VLB manifestando LP apresentam menor porcentagem de linfócitos sofrendo processo de apoptose, fato que deve contribuir para o estabelecimento da LP, porém os índices de proliferação de linfócitos variam em função do período em que ocorreu estímulo antigênico, podendo justificar a divergência de dados verificados por outros autores.

### REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: ARTMED, 2003. 256 p.
- 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.
- 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.
- FLORINS, A.; BOXUS, M.; VANDERMEERS, F.; VERLAETEN, O.; BOUZAR, A.; DEFOICHE, J.; HUBAUX, R.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: A rationale for host susceptibility to disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmed.com>>. Acesso em: 10 mai. 2008.

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.

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.

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.

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.

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.

KONNAI, S.; USUI, T.; IKEDA, M.; KOHARA, J.; HIRATA, T.; OKADA, K.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Tumor necrosis factor-alpha up-regulation in spontaneously proliferating cells derived from bovine leukemia virus-infected cattle. **Archives of Virology**, v. 151, n. 2, p. 347-360, 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.

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.

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.

OHSHIMA, K. Pathological features of diseases associated with human T-cell leukemia virus type I. **Cancer Science**, v. 98, n. 6, p. 772-778, 2007.

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 jun. 2008.

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.

ORLIK, O.; SPLITTER, G. A. Optimization of lymphocyte proliferation assay for cells with high spontaneous proliferation in vivo: CD4+ T cell proliferation in bovine leukemia virus infected animals with persistent lymphocytosis. **Journal of Immunological Methods**. v. 199, n. 2, p. 159-165, 1996.

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.

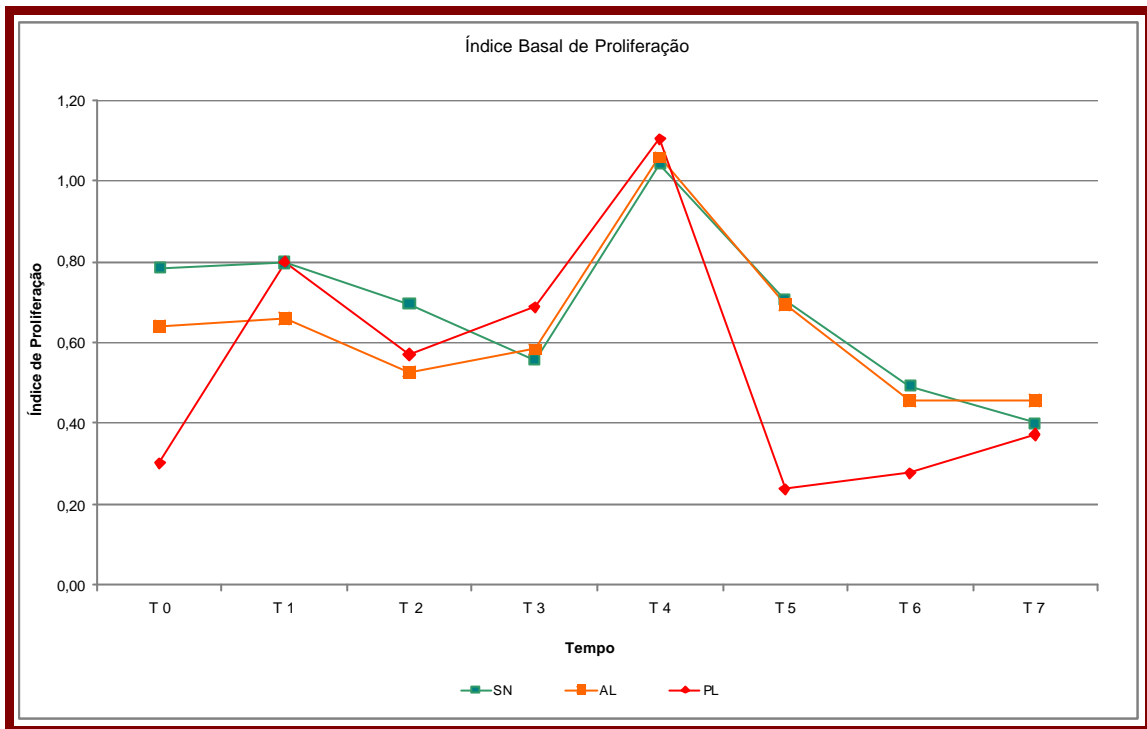
SAGATA, N.; YASUNAGA, T.; TSUZUKU-KAWAMURA, J.; OHISHI, K.; OGAWA, Y.; IKAWA, Y. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 3, p. 677-681, 1985.

SCHWARTZ, I.; BENSALD, A.; POLACK, B.; PERRIN, B.; BERTHELEMY, M.; LEVY, D. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. **Journal of Virology**, v. 68, n. 7, p. 4589-4596, 1994.

SCHWARTZ, I.; LEVY, D. Pathobiology of bovine leukemia virus. **The Veterinary Research**, v. 25, n. 6, p. 521-536, 1994.

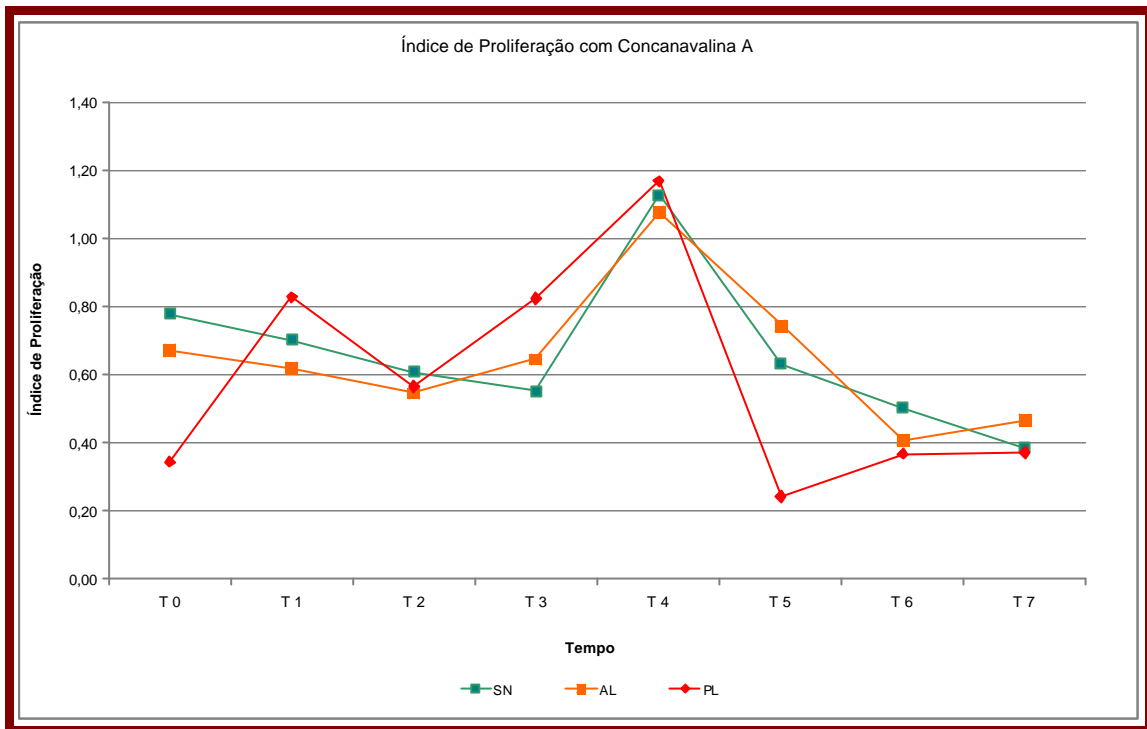
TAVORA, J. P. F. **Prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em rebanhos leiteiros criados na região do pólo Itabuna, Estado da Bahia**. 1990. 106 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São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

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.



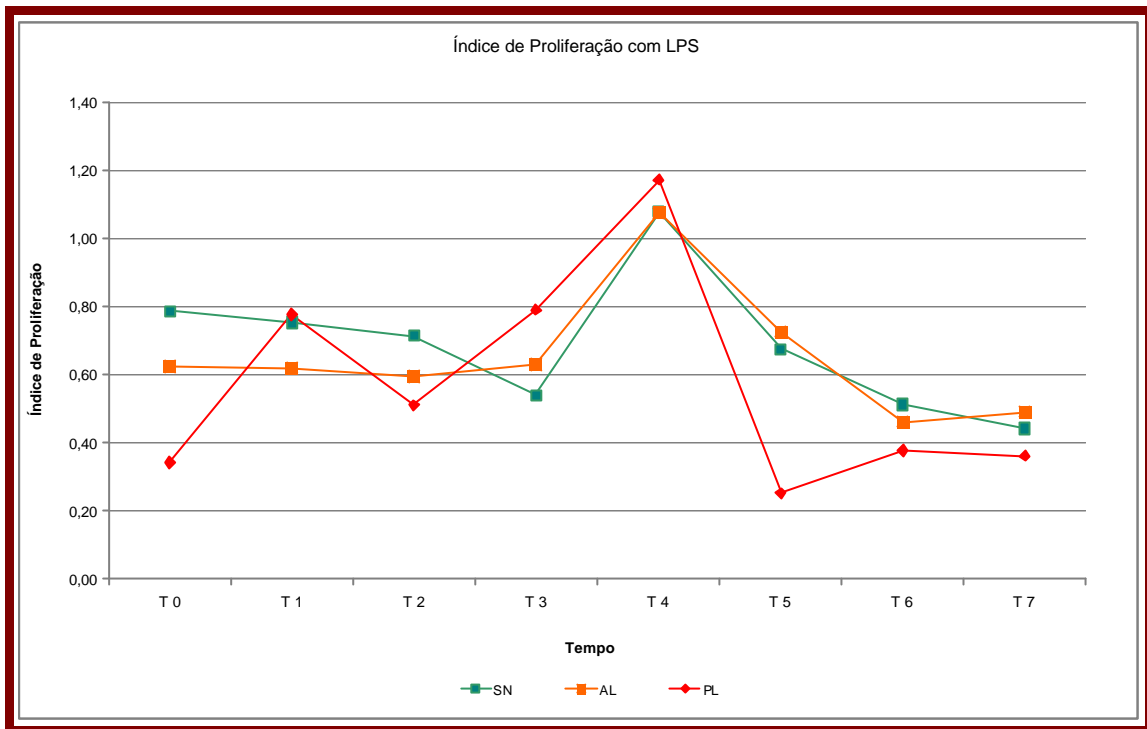
**Figura 1** – Índices basais de proliferação de linfócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental a cada tempo de coleta<sup>1</sup> – São Paulo – 2008.

<sup>1</sup> **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo PL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio.



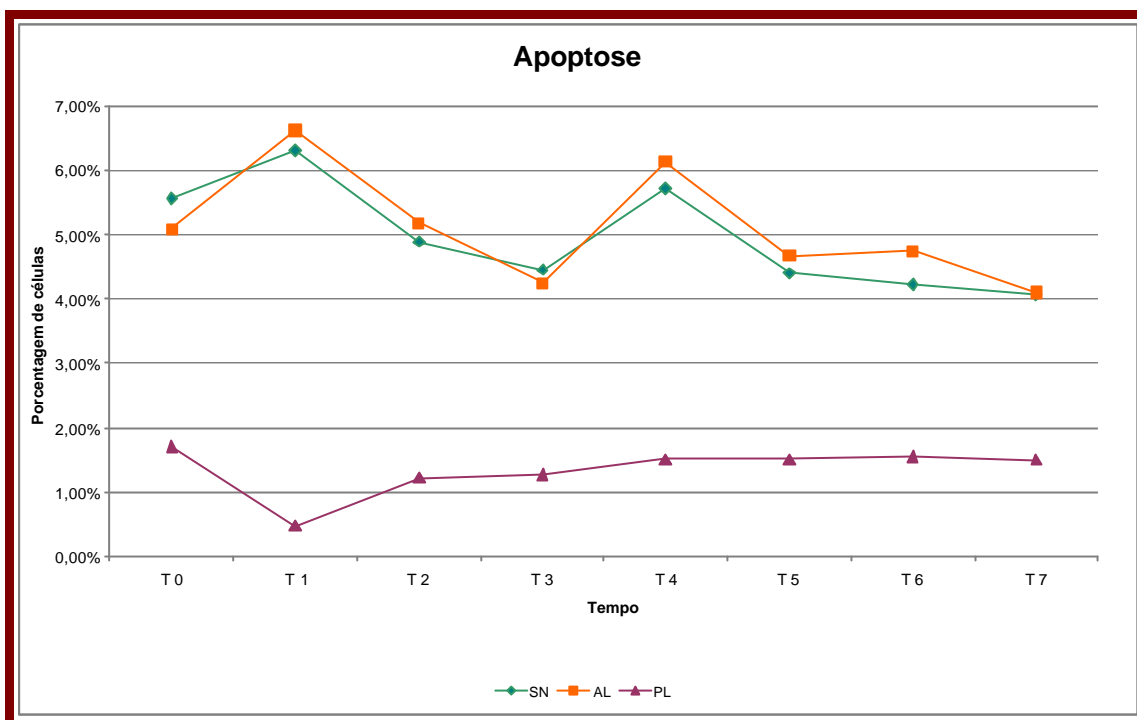
**Figura 2** – Índices de proliferação, após estímulo *in vitro* com concanavalina-A, de linfócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental, a cada tempo de coleta<sup>1</sup> – São Paulo – 2008.

<sup>1</sup> **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo PL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio.



**Figura 3** – Índices de proliferação, após estímulo *in vitro* com lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli*, de linfócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental, a cada tempo de coleta<sup>1</sup> – São Paulo – 2008.

<sup>1</sup> **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo PL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio.



**Figura 4** – Porcentagens médias de linfócitos em processo de apoptose em células obtidas de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta<sup>1</sup> – São Paulo – 2008.

<sup>1</sup> **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo PL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio.