

Influência do vírus da leucemia bovina sobre a atividade imunológica por meio da função neutrofílica

Influence of the Bovine Leukemia Virus on the Immunological Activity by the Neutrophilic Function

Vinícius Bigolin Narciso¹, Silvana Giacomini Collet¹, Lilian Kolling Girardini¹, Fernando Nogueira Souza², Alcione Santa Catarina³, Alice Maria Melville Paiva Della Libera², Carla Sabedot¹, Thais Regina Brunetto¹, Marla Schneider³ & Maiara García Blagitz³

ABSTRACT

Background: Bovine leukemia virus (VLB) is an oncogenic deltaretrovirus associated with the development of persistent lymphocytosis (LP) and lymphosarcomas in cattle. LP is characterized by chronic elevation of the number of circulating lymphocytes, in the case of B lymphocytes. Several studies have described functional changes in various leukocyte populations in both blood and milk in VLB-infected animals. The impact of some chronic diseases of low lethality is aggravated by the emergence of comorbidities. The objective of the present study was to evaluate the oxidative metabolism and neutrophil phagocytosis of bovines of the Holstein breed naturally infected with the bovine leukemia virus (VLB).

Materials, Methods & Results: In this study, 20 cows were divided into three groups: (NG) seven non-seroreagent animals for VLB and without hematological alterations; (GAL) eight seroreagent animals for VLB and without hematological alterations; and (GLP) five seroreagent animals for VLB with persistent lymphocytosis (LP). The oxidative metabolism of neutrophils was determined by the tetrazolium nitroblast reduction test stimulated or not with Zymosan particles. The percentage of neutrophils that phagocytosed Zymosan particle (s) was also evaluated. The data were initially evaluated for normality and homoscedasticity by the Shapiro-Wilk test. Then the ANOVA test followed by the Student-Newman-Keuls test was applied for the comparison between the NG, GAL and GLP animals. Comparison between the NG animals and the seroreagent animals for the VLB (GVLB) was also performed through the unpaired Student's t-test. The value of $P < 0.05$ was considered significant. No significant differences were observed in oxidative neutrophil metabolism in stimulated and non-stimulated samples with Zymosan particles nor in the percentage of neutrophils that phagocytosed Zymosan particle (s) among the three experimental groups. However, as no differences were observed between the seroreagent animals for VLB with and without LP, we chose to divide the animals into only two experimental, non-seroreagent and seroreagent groups for VLB. Thus, when non-seroreagent animals for the VLB were compared with the seroreagent animals for the VLB, which corresponds to the GAL and GLP animals, a significant difference was observed in relation to the oxidative metabolism by neutrophils stimulated with Zymosan particles.

Discussion: Some viral diseases are often associated with increased susceptibility to new infections and several studies have evaluated the role of peripheral blood mononuclear cells in VLB infection, but few studies have investigated neutrophil function. Some authors, when evaluating phagocytic capacity and oxidative metabolism, respectively, of blood leukocytes from VLB-infected animals, observed that VLB-infected animals displaying LP had lower phagocytic capacity and lower production of Reactive Oxygen Species (ROS). Some studies have shown that oxygen consumption by neutrophils was higher in experimentally infected sheep by VLB after 15 weeks of challenge, but this species is not a natural host of the virus, since transmission does not occur between sheep and cattle and the pathogenesis of infection by VLB is more acute in sheep, a result of the lower latency period for LP development. Other authors, when evaluating the interference of VLB in milk leukocytes, concluded that VLB-infected animals show lower intensity of intracellular ROS production by flow cytometry in VLB-infected animals, especially animals expressing LP, despite the fact that percentage of milk neutrophils that produced ROS did not differ between groups. It can be concluded that VLB interferes in neutrophilic function with possible implications for the health of VLB-infected animals and may favor secondary infections.

Keywords: deltaretrovirus, neutrophil, oxidative metabolism, phagocytosis, dairy cows, BLV infection.

Descritores: deltaretrovirus, neutrófilo, metabolismo oxidativo, fagocitose, vacas leiteiras, Leucose Enzoótica Bovina.

DOI: 10.22456/1679-9216.102520

Received: 25 March 2020

Accepted: 17 June 2020

Published: 12 July 2020

¹Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC), Xanxerê, SC, Brazil. ²Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil. ³Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Realeza, PR, Brazil. CORRESPONDENCE: M.G. Blagitz [maiara.azevedo@uffs.edu.br]. UFFS. Av. Edmundo Gaievski n. 1000 - Zona Rural. CEP 85770-000 Realeza, PR, Brazil.

INTRODUÇÃO

O vírus da leucemia bovina (VLB) é um delta-retrovírus oncogênico associado ao desenvolvimento da linfocitose persistente (LP) e linfossarcomas em bovinos [10]. A LP caracteriza-se por um acentuado aumento de linfócitos na corrente sanguínea. Já os linfossarcomas são um aglomerado de tecido linfóide que acomete especialmente o baço, linfonodos, coração, útero e abomaso, podendo estar associado, ou não, a quadros de linfocitose persistente [1].

Vários estudos descreveram alterações funcionais em várias populações leucocitárias tanto no sangue como no leite em animais infectados pelo VLB [1-4,7,9,12,14-16]. Desta forma, o impacto de algumas doenças crônicas com baixa letalidade, como a Leucose Enzoótica Bovina, é muitas vezes subestimado, já que pode favorecer comorbidades [5].

Os neutrófilos são a principal população leucocitária envolvida na resposta imune inata contra microrganismos invasores, através da fagocitose, quando há produção de espécies reativas de oxigênio para matar os microrganismos fagocitados [16]. Com isso, a avaliação do metabolismo oxidativo em neutrófilos é um importante mecanismo a ser investigado em animais infectados pelo VLB. O teste de redução do tetrazólio de nitroazul (NBT) permanece como uma ferramenta eficiente e simples para a avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o metabolismo oxidativo pelo teste NBT e a fagocitose de partículas de Zymosan por neutrófilos de bovinos da raça holandesa naturalmente infectadas pelo VLB.

MATERIAIS E MÉTODOS

Localização

O estudo foi realizado em rebanhos destinados à produção de leite pertencentes à Bacia Leiteira do Oeste catarinense.

Amostragem e coleta

Coletaram-se amostras sanguíneas de 201 fêmeas bovinas adultas da raça holandesa, para análise hematológica e detecção dos anticorpos séricos específicos anti-VLB.

Após o período de 90 dias, a persistência da linfocitose dos animais utilizados foi confirmada, sendo considerados animais apresentando LP aqueles com contagem total de linfócitos superior a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ e contagem total de leucócitos superior a $15 \times 10^3/\mu\text{L}$

[17]. Neste momento, coletou-se amostras de sangue para a avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos pelo teste NBT, e também para análise hematológica e detecção dos anticorpos séricos específicos anti-VLB para a formação dos grupos experimentais.

Desta forma, 20 animais foram selecionados e divididos em três grupos: (GN) 7 animais não sororreagentes para o VLB e sem alterações hematológicas conforme critérios estabelecidos para a espécie [6]; (GAL) 8 animais sororreagentes para o VLB e sem alterações hematológicas [6]; e (GLP) 5 animais sororreagentes para o VLB com LP.

Análise hematológica

Foi realizada por meio de analisador automático (ABC Vet analyzer)¹, onde se obteve a contagem total de leucócitos por μL destes animais, que foi complementada pela contagem diferencial em esfregaços sanguíneos. Para a detecção dos anticorpos séricos específicos anti-VLB, utilizou-se kits comerciais de Imunodifusão em Ágar Gel², o qual extrai o antígeno glicoproteico (gp 51) do envelope do VLB.

Avaliação do metabolismo oxidativo de neutrófilos

A avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi realizado pelo NBT utilizando kit comercial³ [13] com algumas modificações. Nesta técnica, 50 μL de solução de 1,5% de NBT foi homogeneizado com 1 mL de sangue heparinizado na técnica não estimulada (NBT-NE), e para a técnica estimulada (NBT-E) adicionou-se ainda 10 μL de Zymozan A⁴ de *Saccharomyces cerevisiae*. As amostras foram então incubadas a 37°C por 10 min e em seguida os esfregaços sanguíneos foram confeccionados em duplicata e corados com corante Panótico rápido. Com o auxílio da microscopia óptica, na objetiva de imersão (aumento 1000x), realizou-se a contagem de 100 neutrófilos em cada um dos esfregaços sanguíneos. Para o NBT-E e NBT-NE, foram considerados positivos os neutrófilos que reduziram o tetrazólio de nitroazul, ou seja, os neutrófilos que apresentaram grânulos citoplasmáticos de cor violácea ou enegrecida (cristais de formazan), independentemente do número e tamanho das granulações. Na técnica estimulada, os neutrófilos que apresentaram partículas de Zymosan no seu interior foram considerados positivos para a fagocitose.

Análise estatística

Os dados foram inicialmente avaliados quanto a normalidade e homocedasticidade pelo teste Shapiro-

-Wilk. Em seguida, aplicou-se o teste ANOVA seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls para a comparação entre os animais GN, GAL e GLP. Também foi realizada a comparação entre os animais do GN e os animais sororreagentes para o VLB (GVLB) através do teste t-Student não pareado. O valor de $P < 0.05$ foi considerado como significativo.

RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão sumarizados nas Tabelas 1 e 2. Não foram observadas diferenças significativas no metabolismo oxidativo de neutrófilos em amostras estimuladas e não estimuladas com partículas de Zymosan, nem na porcentagem de neutrófilos que fagocitaram partícula(s) de Zymosan entre os três grupos experimentais (Tabela 1). Entretanto, como não foi observado diferenças entre os animais sororreagentes para o VLB com e sem LP (dados não demonstrados), optou-se por dividir os animais em apenas dois grupos experimentais, ou seja, não sororreagentes e sororreagentes para o VLB. Assim, quando os animais não sororreagentes para o VLB foram comparados com os animais sororreagentes para o VLB, que corresponde aos animais do GAL e GLP, observou-se diferença significativa em relação ao metabolismo oxidativo por neutrófilos estimulados com partículas de Zymosan (Tabela 2).

Tabela 1. Porcentagens de neutrófilos redutores do tetrazólio de nitroazul na prova estimulada (NBT-E) e não estimulada (NBT-NE), e que fagocitaram partícula(s) de Zymosan em animais não sororreagentes para o vírus da leucemia bovina, e sororreagentes para o vírus da leucemia bovina alinfocitóticos e com linfocitose persistente.

Grupo	NBT-NE	NBT-E	Fagocitose
GN	35,43 ($\pm$ 19,54) ^a	28,86 ($\pm$ 20,49) ^a	34,83 ($\pm$ 21,93) ^a
GAL	40,25 ($\pm$ 15,17) ^a	14,75 ($\pm$ 6,90) ^a	45,57 ($\pm$ 19,75) ^a
GLP	32,60 ($\pm$ 18,92) ^a	15,20 ($\pm$ 6,10) ^a	36,20 ($\pm$ 20,74) ^a
Valor de P	0,74	0,11	0,61

GN: Animais não sororreagentes para o vírus da leucemia bovina (n= 7); GAL: Animais sororreagentes para o vírus da leucemia bovina alinfocitóticos (n= 8); GPL: Animais sororreagentes para o vírus da leucemia bovina com linfocitose persistente (n= 5). Letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre as linhas.

Tabela 2. Porcentagens de neutrófilos redutores do tetrazólio de nitroazul na prova estimulada (NBT-E) e não estimulada (NBT-NE), e que fagocitaram partícula(s) de Zymosan em animais não sororreagentes e sororreagentes para o vírus da leucemia bovina.

Grupo	NBT-NE	NBT-E	Fagocitose
GN	35,43 ($\pm$ 19,54) ^a	28,86 ($\pm$ 20,49) ^a	34,83 ($\pm$ 21,93) ^a
GVLB	37,31 ($\pm$ 16,39) ^a	14,92 ($\pm$ 6,34) ^b	41,67 ($\pm$ 19,81) ^a
Valor de P	0,82	0,03	0,51

GN: Animais não sororreagentes para o vírus da leucemia bovina (n= 7); GVLB: Animais sororreagentes para o vírus da leucemia bovina (n= 13). Letras minúsculas diferentes indicam $P \leq 0,05$ entre as linhas.

DISCUSSÃO

Algumas doenças virais estão frequentemente associadas com aumento da susceptibilidade a novas infecções [5,16,18]. Vários estudos avaliaram o papel das células mononucleares do sangue periférico na infecção pelo VLB [2,4,7-10,12,14,16], no entanto poucos estudos investigaram a função neutrofílica [16,18]. A prova do NBT é eficaz para avaliar o metabolismo oxidativo de neutrófilos, sendo a técnica de escolha para este estudo [11].

Alguns autores, ao avaliar a capacidade fagocítica e o metabolismo oxidativo, respectivamente, de leucócitos sanguíneos de animais infectados pelo VLB, observaram que animais infectados pelo VLB manifestando LP apresentaram menor capacidade fagocítica e menor produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) [1,3,7]. No entanto, estas alterações podem ser devido à menor quantidade relativa de neutrófilo, decorrente do expressivo aumento das células B nos animais infectados pelo VLB com LP [4]. Desta forma, estes trabalhos diferem do presente estudo que avaliou especificamente a resposta neutrofílica.

Alguns autores demonstraram que o consumo de oxigênio pelos neutrófilos foi maior em ovinos experimentalmente infectados pelo VLB após 15 semanas do desafio [18]. No entanto, não observaram nenhuma diferença no consumo de oxigênio associado à fagocitose e na capacidade microbicida. Apesar das ovelhas apresentarem como modelo para o estudo da manifestação da LP na infecção pelo VLB, esta espécie não é hospedeira natural do vírus, visto que a transmissão não ocorre entre ovinos e bovinos. Adicionalmente a isto, a patogênese da infecção pelo VLB apresenta-se mais aguda em ovinos, uma vez que essa espécie possui um período de latência menor para as primeiras manifestações da LP. Além disso, quase todos os ovinos infectados sucumbem decorrentes da infecção pelo VLB, o que ocorre em apenas cerca de 5% dos bovinos. Uma das principais diferenças se refere a carga viral, onde a maioria dos bovinos que permanecem clinicamente saudáveis apresentam apenas 1% ou menos dos leucócitos infectados, ou seja, a carga viral permanece relativamente constante por longos períodos. Em ovinos, o número de células infectadas aumenta gradualmente até o início da leucemia [8]. Portanto, a discrepância na patogênese do VLB em ovinos experimentalmente infectados e em bovinos naturalmente infectados podem justificar a divergência dos resultados encontrados.

Souza *et al.* [16] não observaram diferença entre os animais sadios e infectados pelo VLB com o emprego da citometria de fluxo para avaliar a porcentagem e intensidade de leucócitos polimorfonucleares que produziram ERO, sendo eles estimulados, ou não, por *Staphylococcus*. Porém, estes mesmos autores observaram redução da intensidade de produção de ERO pelos leucócitos polimorfonucleares estimulados por *Escherichia coli* em animais infectados pelo VLB. Estes resultados, pelo menos em parte, corroboram com os dados do presente estudo, onde não se observou alterações na porcentagem de neutrófilos redutores do tetrazólio de nitroazul na prova não estimulada entre os animais sadios e os sororreagentes para o VLB, embora que na prova estimulada com partículas de Zymosan, a porcentagem de neutrófilos redutores do tetrazólio de nitroazul foi menor nos animais sororreagentes para o VLB.

Ao avaliar a interferência do VLB em leucócitos do leite, alguns autores concluíram que os animais infectados pelo VLB apresentam menor intensidade de produção intracelular de ERO pelos neutrófilos do leite por citometria de fluxo nos animais infectados

pelo VLB especialmente os animais manifestando LP, apesar da porcentagem de neutrófilos do leite que produziram ERO não ter diferido entre os grupos [5].

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o VLB interfere na função neutrofílica, demonstrada no presente estudo principalmente pelo menor metabolismo oxidativo produzido por neutrófilos estimulados com partículas de Zymosan, com possíveis implicações para a saúde dos animais infectados pelo VLB, favorecendo comorbidades.

MANUFACTURERS

¹Horiba ABX SAS. Montpellier, France.

²Instituto de Tecnologia do Paraná - Tecpar. Curitiba, PR, Brazil.

³AMRESO Inc. Solon, OH, USA.

⁴Sigma-Aldrich. Saint Louis, MO, USA.

Ethical approval. The research project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of Universidade do Oeste de Santa Catarina under protocol number 026/2014.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Azedo M.R., Massoco C.O., Blagitz M.G., Sanches B.G.S., Souza F.N., Batista C.F., Sakai M., SÁ-Rocha L.C., Kfoury Junior J.R., Stricagnolo C.R., Benesi F.J. & Della Libera A.M.M.P. 2008. Influência da Leucose Enzoótica Bovina na função fagocítica de leucócitos circulantes em animais manifestando linfocitose persistente. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*. 45(5): 390-397.
- 2 Azedo M.R., Blagitz M.G., Souza F.N., Benesi F.J. & Della Libera A.M.M.P. 2011. Avaliação funcional de monócitos de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 63(5): 1131-1140.
- 3 Azedo M.R., Massoco C.O., Blagitz M.G., Souza F.N., Pogliani F.C., Benesi F.J. & Della Libera A.M.M.P. 2012. Metabolismo oxidativo de leucócitos em animais infectados pelo Vírus da Leucemia Bovina. *Brazilian Journal of Veterinary Research*. 49: 93-101.
- 4 Della Libera A.M.M.P., Blagitz M.G., Batista C.F., Latorre A.O., Stricagnolo C.R. & Souza F.N. 2012. Quantification of B cells and T lymphocytes subsets in bovine leukemia virus infected dairy cows. *Semina: Ciências Agrárias*. 33: 1487-1494.
- 5 Della Libera A.M.M.P., Souza F.N., Batista C.F., Santos B.P., Azevedo L.F.F., Sanchez E.M.R., Diniz S.A., Silva M.X., Haddad J.P. & Blagitz M.G. 2015. Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. *Veterinary Research*. 46(2): DOI: 10.1186/s13567-014-0125-4
- 6 Divers T.J. & Peek S.F. 2008. *Rebhun's Disease of Dairy Cattle*. 2nd edn. St. Louis: Saunders Elsevier, 686p.
- 7 Ferronato J.A., Blagitz M.G., Souza F.N., Batista C.F., Azevedo L.F.F. & Della Libera A.M.M.P. 2017. Avaliação funcional de neutrófilos sanguíneos em vacas leiteiras infectadas pelo vírus da leucemia bovina. In: *XII Congresso Brasileiro de Buiatria* (Foz do Iguaçu, Brazil). *Revista Acadêmica Ciência Animal*. 15(Supl 2): 669-670.
- 8 Florins A., Gillet N., Asquith B., Boxus M., Burtheau C., Twizere J.C., Urbain P., Vandermeers F., Debacq C., Sanchez-Alcaraz M.T., Schwartz-Cornil I., Kerkhofs P., Jean G., Théwis A., Hay J., Mortreux F., Wattel E., Reichert M., Burny A., Kettman R., Bangham C. & Willems L. 2007. Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Frontiers in Bioscience*. 12: 1520-1531.

- 9 Frie M.C. & Coussens P.M. 2015. Bovine leukemia virus: a major silent threat to proper immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 163: 103-114.
- 10 Gillet N., Florins A., Boxus M., Burteau C., Nigro A., Vandermeers F., Balon H., Bouzar A. B., Defoiche J., Burny A., Reichert M., Kettman R. & Willems L. 2007. Mechanisms of leukomogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 4(18): doi: 10.1186/1742-4690-4-18
- 11 Gucchait A., Joardar N., Parida P.K., Roy P., Mukherjee N., Dutta A., Yesuvadian R., Sinha Babu S.P., Jana K. & Misra A.K. 2018. Development of novel anti-filarial agents using carbamo (dithioperoxo) thioate derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 143: 598-610.
- 12 Madureira K.M., Baldacim V.A.P., Costa J.F.R., Silva C.P.C., Arcaro J.R.P., Miranda M.S., Sousa R.S., Fagliari J.J. & Gomes V. 2017. Resposta imunocelular em vacas Holandesas soropositivas para o vírus da Leucose Bovina (BLV) durante o período de transição. In: *XII Congresso Brasileiro de Buiatria* (Foz do Iguaçu, Brazil). *Revista Acadêmica Ciência Animal*. 15 (Supl 2): 33-34.
- 13 Park B.H. & Good R.A. 1970. NBT test stimulated. *Lancet*. 269(7673): 616.
- 14 Souza F.N., Latorre A.O., Carniceiro B.D., Sakai M., Kieling K., Blagitz M.G. & Della Libera A.M.M.P. 2011. Proliferação de linfócitos e apoptose de células CD5+ de bovinos infectados pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 63: 1124-1130.
- 15 Souza F.N., Monteiro A.M., Santos P.R., Sanchez E.M.R., Blagitz M.G., Latorre A.O., Figueiredo Neto A.M., Gidlund M. & Della Libera A.M.M.P. 2011. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in bovine leukemia virus-infected dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 143: 162-166.
- 16 Souza F.N., Blagitz M.G., Latorre A.O., Ramos Sanchez E.M., Batista C.F., Weigel R.A., Rennó F.P., Sucupira M.C.A. & Della Libera A.M.M.P. 2012. Intracellular reactive oxygen production by polymorphonuclear leukocytes in bovine leukemia virus-infected dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science*. 74: 221-225.
- 17 Thurmond M.C., Carter R.L., Picanso J.P. & Stralka K. 1990. Upper-normal prediction limits of lymphocyte count for cattle not infected with bovine leukemia virus. *American Journal of Veterinary Research*. 51: 466-470.
- 18 Walker A.F., Lumsden J.H. & Stirtzinger T. 1987. Neutrophil function in sheep experimentally infected with bovine leukemia virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 14: 67-76.