

## **BOVINOS DESAFIADOS COM LIPOPOLISSACARÍDEO APRESENTAM UMA RESPOSTA LEUCOCITÁRIA?**

**JÉSSICA LAZZARI<sup>1</sup>; ANDRESSA STEIN MAFFI<sup>2</sup>, JOAO ALVEIRO ALVARADO RINCON<sup>3</sup>, LARISSA TAVARES<sup>4</sup>, ANTÔNIO AMARAL BARBOSA<sup>5</sup>, FRANCISCO DEL PINO<sup>6</sup>**

*<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – jelazzari@hotmail.com*

*<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas - andressamaffi@gmail.com*

*<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - joaoal13@hotmail.com*

*<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - larissatav.21@gmail.com*

*<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - antoniobarbosa.vet@hotmail.com*

*<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas - fabdelpino@gmail.com*

### **1. INTRODUÇÃO**

Em quadros infecciosos, o organismo reage à agressão organizando uma resposta imune mediada por leucócitos. Na primeira linha de defesa, há a ação de neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos. Os leucócitos, cada um com suas particularidades, atuam juntamente na reação inflamatória frente às lesões causadas por bactérias, vírus, fungos ou parasitas (CRUVINEL et al, 2010). Essas células são responsáveis pela fagocitose, diferenciação em células maduras, denominadas de macrófagos e liberação de mediadores químicos (CRUVINEL et al, 2010). Em seguida, ocorre a formação da imunidade adquirida por meio dos linfócitos e anticorpos que constituem uma resposta específica, caracterizada pela diversidade de reconhecimento e memória (TIZARD 2009).

Nos casos de infecções bacterianas por microrganismos gram negativos, o reconhecimento e montagem da resposta imune é desencadeada pelo reconhecimento do constituinte de membrana denominado lipopolissacarídeo (LPS) (PERIASAMY; PRAVEENA; SINGH, 2018). Esta endotoxina é composta pelo lipídio A e o antígeno O, que possui grande variabilidade entre os patógenos, fato que dificulta a identificação pelo sistema imune. Consequentemente, prejudica a ação de anticorpos e de células fagocíticas (BERTANI; RUIZ, 2018).

No hospedeiro, até certo limiar, o LPS estimula os mecanismos de defesa através do aumento de citocinas e quimiocinas e da proliferação celular. Contudo, em níveis mais elevados, induz a apoptose de células imunocompetentes e, pelo dano tecidual subsequente, agrava ainda mais a resposta inflamatória (PERIASAMY; PRAVEENA; SINGH, 2018). São escassos os estudos que avaliam o comportamento dessas células de forma controlada em bovinos, dessa forma, objetivou-se avaliar a resposta leucocitária em bovinos desafiados com LPS.

### **2. METODOLOGIA**

Para o estudo, 16 novilhas de corte, em média com 14 meses de idade, criadas sob sistema de confinamento foram divididas aleatoriamente em dois grupos. O grupo LPS (n=8) recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) contendo 0,5 µg/kg de peso corporal de LPS (Sigma Aldrich®, Missouri, EUA) por via intravenosa com intervalo de 24 horas. O grupo controle (n=8) recebeu duas aplicações de 2 mL de solução salina (0,9% de NaCl) com o mesmo intervalo.

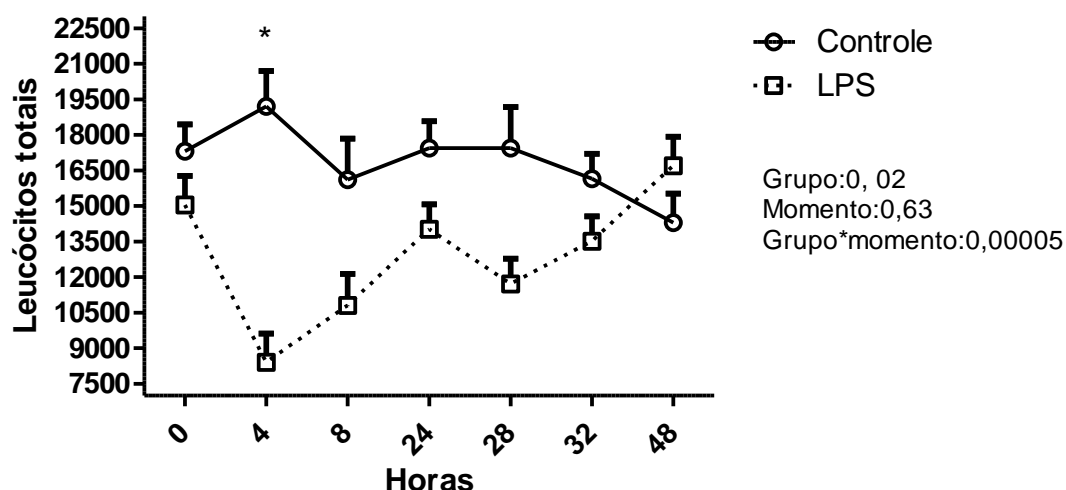
A coleta de sangue em tubos contendo EDTA para quantificação de leucócitos totais ocorreu previamente à primeira aplicação de LPS e nas horas 4,

8, 24, 28, 32 e 48 subsequentes ao desafio nos dois grupos. Esta contagem foi realizada com a utilização do equipamento automático BC2800 VET (Mindray, Schenzhen, China).

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil (Protocolo 9364). A análise estatística considerou como fator fixo o desafio com LPS (grupo desafiado vs. grupo controle) sendo a contagem de leucócitos totais considerada como variável principal. Os dados foram submetidos a análise de ANOVA One Way do pacote estatístico NCSS (2005).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais desafiados (LPS) apresentaram uma contagem de leucócitos totais inferior ao grupo controle (LPS:  $12884,64 \pm 1129,17$ ; Controle:  $17029,54 \pm 1129,17$ ;  $P=0,02$ ). Além disso, ao avaliar a proporção de leucócitos totais no decorrer das horas após as infusões de LPS (Figura 1), observou-se a redução leucométrica na hora quatro ( $P=0,00005$ ) nos animais desafiados.



**Figura 1.** Leucócitos totais de novilhas desafiadas ou não com lipopolissacarídeo intravenoso às 0 e 24 horas.

Analisando os efeitos sobre os subgrupos de leucócitos, Diez-Fraile et al. (2003) concluíram que há uma diminuição sérica das células polimorfonucleadas em vacas leiteiras em decorrência das alterações nas moléculas de adesão (L-selectina e  $\beta 2$  – integrinas). Mais especificamente, Periasamy, Praveena e Singh (2018) observaram a apoptose de neutrófilos de bovinos entre três a seis horas após as infusões LPS como consequência da disfunção mitocondrial.

No estudo desenvolvido por Peñailillo et al. (2016) em coelhos, cuja administração também foi via intravenosa, houve na hora quatro a diminuição do número de linfócitos em virtude do sequestro rápido dessas células em resposta à invasão. Além disso, também averiguaram a ocorrência de alterações com menor intensidade nas horas subsequentes a segunda aplicação, o que sugere o desenvolvimento de tolerância ao LPS. Um padrão semelhante pode ser observado em nosso estudo, onde a redução nos níveis de leucócitos totais foi mais marcada após a primeira aplicação, demonstrando claramente uma resposta inerente à infusão de LPS, havendo um retorno gradual aos níveis iniciais, porém somente equilibrando-se novamente após 48 horas do desafio. Isso indica o potencial

imunossupressor do LPS (mesmo que de forma artificial/induzida) no organismo animal. Assim, pressupõe-se um maior impacto na contagem de leucócitos totais em situações de infecções mais agudas e/ou prolongadas.

#### 4. CONCLUSÕES

Bovinos desafiados com lipopolissarídeo apresentam diminuição de leucócitos, corroborando o comprometimento inicial do sistema imune. Entretanto, os mecanismos pelos quais isso acontecem ainda não foram bem elucidados. Assim, remete à necessidade do desenvolvimento de novos estudos que busquem medidas preventivas ou complementares aos tratamentos atuais visando suporte ao sistema imune, e sua maior eficiência frente a patógenos.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTANI, B.; RUIZ, N. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.

CRUVINEL, W. D. M., MESQUITA JÚNIOR, D., ARAÚJO, J. A. P., CATELAN, T. T., SOUZA, A. W. S. D., SILVA, N. P. D., ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

DIEZ-FRAILE, A.; MEYER, E.; DUCHATEAU, L.; BURVENICH, C. L-selectin and  $\beta$ 2-integrin expression on circulating bovine polymorphonuclear leukocytes during endotoxin mastitis. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 7, p. 2334-2342, 2003.

PEÑAILILLO, A. K.; SEPULVEDA, M. A.; PALMA, C. J.; ESPINOZA, A.; AGUILERA, M.; BURGOSC, R. A.; CARRETTAC, D.; ISLASB, A.; PÉREZ, R. Haematological and blood biochemical changes induced by the administration of low doses of *Escherichia coli* lipopolysaccharide in rabbits. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 48, n. 3, p. 315-320, 2016.

PERIASAMY, S.; PRAVEENA, P. E.; SINGH, N. Effects of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharides on bovine leukocytes. **Microbial pathogenesis**, v. 119, p. 225-232, 2018.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 9. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

WALLER, K. P.; COLDITZ, I. G.; LUN, S.; OSTENSSON, K. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 74, n. 1, p. 31-36, 2003.

YATES, D. T.; LÖEST, C. A.; ROSS, T. T.; HALLFORD, D. M.; CARTER, B. H.; LIMESAND, S. W. Effects of bacterial lipopolysaccharide injection on white blood cell counts, hematological variables, and serum glucose, insulin, and cortisol



concentrations in ewes fed low-or high-protein diets. **Journal of animal science**, v. 89, n. 12, p. 4286-4293, 2011.