



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CAMPUS II – AREIA-PB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

EWERTON DE SOUZA LIMA

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS LÁCTEOS EM VACAS
LEITEIRAS INFECTADAS NATURALMENTE PELO VÍRUS DA LEUCEMIA
BOVINA**

**AREIA
2020**

EWERTON DE SOUZA LIMA

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS LÁCTEOS EM VACAS
LEITEIRAS INFECTADAS NATURALMENTE PELO VÍRUS DA LEUCEMIA
BOVINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Medicina Veterinária pela
Universidade Federal da Paraíba.

Orientador: Prof. Dr. Artur Cezar de Carvalho
Fernandes.

**AREIA
2020**

Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

L693a Lima, Ewerton de Souza.

Avaliação funcional de macrófagos lácteos em vacas leiteiras infectadas naturalmente pelo vírus da leucemia bovina / Ewerton de Souza Lima. -
Areia:UFPB/CCA, 2020.

39 f. : il.

Orientação: Artur Cezar de Carvalho Fernandes. TCC (Graduação)
- UFPB/CCA.

1. Imunologia. 2. Glândula mamária. 3. Leucose bovina.
I. Fernandes, Artur Cezar de Carvalho. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09(02)

EWERTON DE SOUZA LIMA

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS LÁCTEOS EM VACAS LEITEIRAS
INFECTADAS NATURALMENTE PELO VÍRUS DA LEUCEMIA BOVINA

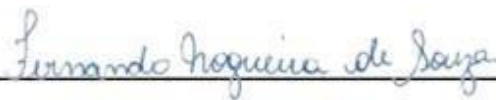
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Medicina Veterinária pela
Universidade Federal da Paraíba.

Aprovado em: 07/12/2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Artur Cezar de Carvalho Fernandes
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dr. Fernando Nogueira de Souza
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dr. Sara Vilar Dantas Simões
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Dedicatória

A minha família, sinônimo de apoio, aconchego e amor, e, em especial, a meu pai, Geraldo Lopes, minha mãe, Edvânia Souza, minha irmã, Erisvânia Lima, minha sobrinha, Mickaella Vitória, minhas avós, Laura Venâncio, Josefa Lopes (*in memoriam*) e Severina de Medeiros (*in memoriam*). Vocês são exemplos de valores, luta, garra, dedicação e determinação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por permitir a concretização de um sonho. Obrigado por me fazer forte durante todo o percurso da graduação, por me fazer sentir-se guiado e amparado em situações que pareciam difíceis. Obrigado por ter me dado forças, e em momentos, acreditado em situações que nem eu mesmo acreditava que seria capaz e possível de realizar. Obrigado por fazer-se presente em minha vida me protegendo e guiando meus passos, obrigado por toda sabedoria, saúde e determinações diárias.

Aos meus pais, exemplos de força, garra, determinação, amor ao próximo, por me incentivarem e acreditarem em meu potencial, por todo o aprendizado e educação, valores, suporte e, principalmente, pelo amor que sempre demonstraram com toda proteção. Vocês são extremamente importantes em minha vida, eu nada seria sem vocês. A meu pai pelo seu exemplo de pai, que sempre dedicou sua vida para dar aos seus filhos aquilo que não teve em sua infância, o acesso à educação, nascido no sertão, o destino o obrigou a escolher entre a escola e o trabalho árduo do roçado. Ao passar dos anos, Deus o presenteou com o dom de ser inteligente (autodidata), aprendeu a ler e a escrever sem ir a uma escola. Pai, obrigado por tudo, você é meu orgulho.

A minha mãe, mulher forte, guerreira, protetora, que não mede esforços para ajudar o próximo. Aprendi com a sua bondade de sempre estar disposto em ajudar o próximo. Meu grande exemplo de mulher, batalhadora que trabalha desde a sua infância, e se orgulha por ser uma grande MÃE, a senhora é essencial em minha vida, em minha formação. Meu amor por vocês é incondicional.

A minha irmã, exemplo de força, amizade, carinho, incentivo, torcida.

A minha sobrinha, uma criança linda, doce, amável e agradável. Por ela, meu motivo de força, garra e dedicação. A você todo meu amor, nosso milagre!

A minha avó Laura, por todo carinho, torcida para a minha aprovação no vestibular, incentivo, cuidados e encorajamento. Você é essencial em minha vida.

A minha avó Josefa Lopes (*in memoriam*) embora fisicamente ausente, sentia sua presença ao meu lado, dando-me forças para continuar. Obrigado por todo o carinho, minha avó!

A minha avó Severina de Medeiros (*in memoriam*) mesmo não sendo de sangue, você foi um presente de Deus em minha vida. Com você aprendi a amar o próximo e fazer

o bem. Com você eu senti o verdadeiro motivo de solidariedade, fraternidade e amor ao próximo. Obrigado por ter existido em minha vida, você sempre será o meu anjo.

Ao meu grande incentivador, que considero como um pai acadêmico, Orientador Profº Dr. Artur Cezar de Carvalho Fernandes. Essencial em minha carreira acadêmica. Aprendi e aprendo todos os dias como ser solidário com o próximo, como partilhar conhecimentos e ajudar o próximo. Aprendo todos os dias o seu lado humanitário, compassivo e compreensivo. Exemplo de profissional, Médico Veterinário, Professor, Mestre e Orientador. Tem o seu jeito único de ser generoso e calmo. Aquele que faz com maestria o que sabe fazer de melhor, lecionar. Aquele professor que se preocupa com o seu orientando. Aquele que chega e conversa, que tira dúvidas e aconselha. Agradeço a Deus por tê-lo colocado em meu caminho, por ter aceito o convite de ser meu Orientador. Obrigado pela orientação, apoio, conversas, conselhos, ensinamentos, paciência, confiança, pelo exemplo de profissional, prestativo e dedicado em tudo o que faz. Graças aos seus ensinamentos, tornei-me mais cativado pela carreira da docência e pesquisa. Serei eternamente grato por tudo o que vem me proporcionando.

Em especial, agradeço ao professor Fernando Nogueira, que apesar de pouco tempo, já se tornou um professor muito querido. Obrigado pela confiança, orientações, ensinamentos, atenção e conversas produtivas, que sem dúvidas foram essenciais para o meu aprendizado. Obrigado por somar em minha formação e por ter agregado valor em meu aprendizado. Todo meu respeito e admiração pelo professor e pesquisador incrível que és. Você foi fundamental nesta etapa da minha vida. Com você tornei-me mais cativado pelo incrível mundo da mastite e imunologia da glândula mamária.

Aos professores do Curso de Medicina Veterinária- UFPB, pelos aprendizados e conhecimentos compartilhados. Em especial, Profª Suzana Araújo, uma grande incentivadora, mentora de monitoria, o ponta pé inicial para admiração da carreira acadêmica, Profª Sara Vilar exemplo de profissional e pessoa, por todos os ensinamentos, oportunidades de extensão e compartilhamentos de experiência à campo, Profª Érika Fonseca por todos os ensinamentos, conversas, amizade, incentivo e torcida.

Ao laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, que me recebeu de braços abertos desde o segundo período da graduação, me acolhendo no desenvolvimento da pesquisa e extensão.

Aos residentes do Hospital Veterinário-UFPB Iolanda, Luiz Henrique, Vinícius, Cláudio e Kaliane Costa por todos os ensinamentos, paciência e contribuições.

Aos técnicos e servidores do Hospital Veterinário, em especial Diogo e Sara, pela amizade, ajuda, auxílio e colaboração nas análises dos projetos e processamento dos materiais.

Aos meus amigos Wallace, Ramon, Georgia Heloiza, Rayanne Maciel, Anderson, Thiago, Taiane e Thayza que desde o início fizeram parte desta conquista. A jornada se torna mais leve quando se tem amigos.

Aos colegas da turma XV, companheiros de curso que tornaram a trajetória acadêmica gratificante.

Aos amigos e irmãos que ganhei durante a graduação, em especial Clebson Santos, pela amizade, apoio incondicional, ajuda, viagens a propriedades para coletas, ensinamentos, e o mais significativo, obrigado por me ensinar valores importantes, a bondade e a fraternidade, a você meu respeito e meu muito obrigado.

Aos amigos e irmãos Diêgo “Gordin” e Adriano “Cabeção” por toda amizade, por me apoiar em momentos difíceis, pelas conversas produtivas e conselhos, madrugadas de estudos, ensinamentos e contribuições para o meu crescimento pessoal e profissional. Vocês foram essenciais na minha trajetória acadêmica, a vocês o meu respeito e meu muito obrigado. A meu grande amigo e irmão Ygor Maia, pela amizade, apoio e por compartilhar momentos difíceis e felizes na graduação, pelas conversas produtivas, conselhos e madrugadas de estudos, meu muito obrigado.

Aos integrantes do NAPROSA, em especial Raphael, Márcia e Vitória Maria por toda a ajuda no laboratório de Medicina Veterinária Preventiva.

Aos produtores de leite e colaboradores das propriedades, pela aceitação e disponibilidade em ajudar na realização dos projetos de pesquisa e extensão.

Aos animais, por fazerem parte de toda a trajetória acadêmica e colaborarem com o conhecimento acadêmico e científico.

À banca por fazer parte desta defesa, pelas valiosas contribuições e sugestões.

“Como sou pouco e sei pouco, faço o pouco
que me cabe me dando por inteiro.”

Ariano Suassuna

RESUMO

As implicações do vírus da leucemia bovina (VLB) na resposta imune inata e adaptativa foram amplamente investigadas, no entanto, seus efeitos sobre a imunidade da glândula mamária necessita de maiores investigações. Nesse sentido, o presente estudo investigou a viabilidade, a capacidade fagocítica e a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) por macrófagos e sua viabilidade em amostras de leite de vacas naturalmente infectadas pelo VLB com ou sem linfocitose persistente (PL). Amostras de leite de vacas sorologicamente positivas para VLB manifestando PL apresentaram maior porcentagem de macrófagos (CD14+) em relação a vacas soronegativas para o VLB. Uma maior porcentagem de macrófagos lácteos foi identificada em amostras de animais infectados pelo VLB manifestando PL quando comparados com as amostras de animais AL. A porcentagem de macrófagos lácteos que fagocitaram *S. aureus* em animais soronegativos foi maior em vacas leiteiras infectadas pelo VLB AL. A porcentagem de macrófagos lácteos que produziram ERO e a intensidade de fagocitose não diferiu entre os grupos. Os animais infectados pelo VLB aleucêmicos e com LP apresentaram maior porcentagem de macrófagos lácteos viáveis, enquanto animais sadios apresentaram maior porcentagem de macrófagos lácteos apoptóticos que animais infectados pelo VLB aleucêmicos e com LP. Assim, o presente estudo fornece informações importantes sobre as implicações das infecções por BLV na glândula mamária, impactando a funcionalidade dos macrófagos lácteos em animais infectados pelo BLV, principalmente aqueles que apresentam PL. Os resultados obtidos fornecem novas informações em relação as implicações na glândula mamária das infecções com o BLV, principalmente no que se refere a funcionalidade dos macrófagos nos animais apresentando linfocitose persistente.

Palavras-Chave: Imunologia. Glândula mamária. Leucose bovina.

ABSTRACT

The implications of the bovine leukemia virus (VLB) on the innate and adaptive immune response have been extensively investigated, however, its effects on the mammary gland immunity need further investigation. In this sense, the present study investigated the viability, phagocytic capacity and intracellular production of reactive oxygen species (ROS) by macrophages and their viability in milk samples from cows naturally infected with VLB with or without persistent lymphocytosis (PL). Milk samples from VLB serologically positive cows showing PL showed a higher percentage of macrophages (CD14 +) compared to VLB seronegative cows. A higher percentage of dairy macrophages was identified in samples from animals infected with VLB showing PL when compared to samples from AL animals. The percentage of milk macrophages that phagocytized *S. aureus* in seronegative animals was higher in dairy cows infected with AL VLB. The percentage of milk macrophages that produced ROS and the intensity of phagocytosis did not differ between groups. The animals infected with the leukemic VLB and with LP had a higher percentage of viable dairy macrophages, while healthy animals had a higher percentage of apoptotic dairy macrophages than animals infected with the leukemic VLB and with LP. Thus, the present study provides important information about the implications of BLV infections in the mammary gland, impacting the functionality of milk macrophages in animals infected with BLV, especially those with PL. The results obtained provide new information regarding the implications on the mammary gland of infections with BLV, mainly regarding the functionality of macrophages in animals with persistent lymphocytosis.

Keywords: Immunology. Mammary Gland. Bovine leukosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Porcentagem (média $\pm$ erro-padrão) de macrófagos lácteos (CD14+) de glândulas mamárias sadias em animais soronegativos (BLV-) e infectados pelo vírus da leucemia bovina (BLV+) aleucêmicos (AL) e manifestando linfocitose persistente (PL). Letras diferentes indicam $P \leq 0,05$. * $P = 0,052$ 21
- Figura 2 – Porcentagem (média $\pm$ erro-padrão) de macrófagos lácteos que fagocitaram *S. aureus* em animais soronegativos (BLV-) e infectados pelo vírus da leucemia bovina (BLV+) aleucêmicos (AL) e manifestando linfocitose persistente (PL). Letras diferentes indicam $P \leq 0,05$ 22
- Figura 3 – Porcentagem (média $\pm$ erro-padrão) de macrófagos lácteos viáveis (Annexin-V-/PI-) (A) e em apoptose (Annexin-V+/PI-) (B) em animais soronegativos (BLV-) e infectados pelo vírus da leucemia bovina (BLV+) aleucêmicos (AL) e manifestando linfocitose persistente (PL). Letras diferentes indicam $P \leq 0,05$ 22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Aleucêmica
CCS	Contagem de Células Somáticas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FITC	Isotiocianto de fluoresceína
HTLV	Vírus Linfotrópico T de primatas
IDGA	Imunodifusão em gel de ágar
LEB	Leucose Enzoótica Bovina
mAB	Anticorpo monoclonal
PBS	Solução salina tamponada
PI	Iodeto de propídio
PL	Linfocitose persistente
UFC	Unidade formadora de colônia
VLB	Vírus da Leucemia Bovina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	CAPÍTULO 1	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
4	RESULTADOS	21
5	DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26
	ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY	31

1 INTRODUÇÃO

A leucose enzoótica dos bovinos, enfermidade amplamente disseminada em rebanhos leiteiros em diversos países (Blagitiz et al., 2017), tem como seu agente etiológico o vírus da leucemia bovina (VLB), da família *Retroviridae* e gênero *Deltaretrovírus*. O VLB é um vírus oncogênico e possui tropismo por linfócitos B (Schwartz et al., 1997; Gillet et al., 2007; Della Libera et al., 2012, 2015). Em sua grande maioria a infecção dos bovinos não leva ao desenvolvimento de sintomas nos animais, sendo essas infecções denominadas aleucêmicas (AL) (Blagitiz et al., 2017). No entanto, cerca de 20-30% dos bovinos infectados apresentam uma alteração hematológica conhecida como linfocitose persistente (PL), que é caracterizada por uma expansão policlonal não maligna de linfócitos B. O linfoma de células B, apresentação maligna da enfermidade, é mais rara (Gillet et al., 2007).

Diferentes vírus possuem implicações diretas na função do sistema imune inato e adaptativo (Souza et al., 2012; Della Libera et al., 2015; Blagitiz et al., 2017). Nesse sentido, diversos estudos investigaram os efeitos da infecção por VLB nas subpopulações de linfócitos (Gillet et al., 2007; Suzuki et al., 2013; Della Libera et al., 2015; Nieto Farias et al., 2018), funções de neutrófilos (Rademacher et al., 1977; Souza et al., 2012; Della Libera et al., 2015), células epiteliais mamárias (Cuesta et al., 2018; Cuesta et al., 2019; Cuesta et al., 2020) e macrófagos (Azedo et al., 2011). No entanto, até onde se sabe, os efeitos da infecção por VLB na função dos macrófagos lácteos e sua viabilidade são apenas especulativos.

O impacto de enfermidades virais crônicas com baixa letalidade, sobretudo por VLB possui importância quando correlacionadas a comorbidades, como a mastite, essa enfermidade segue sendo um dos principais problemas sanitários em rebanhos leiteiros, com impacto direto na qualidade do leite e saúde pública devido a veiculação de patógenos e resíduos de antimicrobianos no leite (Della Libera et al., 2015). Nesse sentido, alguns estudos apontaram para associação entre o VLB em rebanhos com alta prevalência de mastite (Emanuelson et al., 1992; Rinaldi et al., 2010), redução da produção de leite devido a imunossupressão causada pelo VLB proporcionando infecções oportunistas, que também são

vistas em outras infecções virais (Norby et al., 2015). Com isso, essas descobertas despertaram questionamentos sobre os efeitos do VLB na imunidade da glândula mamária, na qual os macrófagos configuram como sendo a principal população presente no leite de glândulas mamárias sadias (Lee et al., 1980; Miller et al., 1991; Sarikaya et al., 2004, 2005; Merle et al., 2007; Takano et al., 2018), sendo portanto, as primeiras células de defesa a entrarem em contato com o patógeno causador da mastite.

Neste sentido, considerando a importância dos macrófagos para a glândula mamária durante um processo infeccioso, o presente estudo investigou a viabilidade, a capacidade fagocítica e a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio por macrófagos em amostras de leite de vacas naturalmente infectadas pelo VLB com ou sem linfocitose persistente (PL).

2 CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS LÁCTEOS EM VACAS LEITEIRAS INFECTADAS NATURALMENTE PELO VÍRUS DA LEUCEMIA BOVINA¹

¹ Artigo científico elaborado nas normas da revista Veterinary Immunology and Immunopathology

3 MATERIAL E MÉTODOS

Animais, delineamento experimental e coleta de amostras

Foram utilizadas no estudo 19 vacas leiteiras em diferentes estágios de lactação. Os animais foram testados para o VLB usando um ensaio de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) (Tecpar®, Curitiba, Brasil) e ELISA (cat. n. 284-5, VMRD Pullman Inc., Pullman, WA, EUA), utilizando o antígeno gp51 e submetidos a exames hematológicos para avaliação da leucometria. A contagem total de leucócitos foi determinada usando um contador automático de células (ABX VET ABC, Horiba ABX Diagnostic®, Montpellier, France). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada usando esfregaço sanguíneo.

Os exames sorológicos e hematológicos foram repetidos 110 dias após os exames iniciais, para avaliação de ocorrência de novas soroconversões e confirmação da leucocitose persistente. Nessa mesma ocasião foram coletadas amostras de leite para cultura bacteriológica, contagem de células somáticas e análise funcional de macrófagos por citometria de fluxo.

Dos 19 animais, foram incluídos no estudo apenas 57 quartos mamários sendo excluídos aqueles identificados no teste da caneca telada de fundo escuro com mastite clínica; positivos no exame bacteriológico ou com alta contagem de células somáticas (>200.000 células/mL), devido aos efeitos dos patógenos da mastite bacteriana no perfil e função dos macrófagos (Souza et al., 2012).

Para o exame bacteriológico foram colhidas assepticamente amostras de leite, sendo realizada o pré-dipping, secagem do teto com papel toalha, assepsia do esfíncter do teto com algodão umedecido com álcool a 70% e coleta de leite dos quartos mamários em frascos estéreis. As amostras foram mantidas a 4°C até a chegada ao laboratório e armazenadas a 20°C por no máximo 30 dias até as análises. As análises bacteriológicas foram realizadas através do semeio de 10 µL de leite em placas contendo ágar sangue ovino a 5% desfibrinado. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas. Para a identificação bacteriana foi realizada a observação macroscópica da morfologia das colônias, coloração de Gram e testes bioquímicos (Oliver et al., 2004). Uma amostra de leite foi considerada positiva quando houve o crescimento de uma ou mais colônias (> 100 UFC mL⁻¹) (Piepers et al., 2007; 2013).

As amostras de leite para a determinação da CCS foram coletadas em frascos estéreis de 40 mL contendo micropastilhas do conservante Bronopol (2-bromo-2-nitropano-1,3-diol).

Posteriormente, a CCS foi realizada com o contador automatizado de células somáticas Somacount 300 (Bentley Instruments, Chaska, MN, EUA).

Após os testes sorológicos, hematológicos e avaliação dos quartos mamários os animais foram divididos em três grupos. Grupo 1: 8 animais (24 quartos mamários) soronegativos para o VLB e sem alterações hematológicas; Grupo 2: 6 animais (16 quartos mamários) infectados pelo VLB e sem alterações hematológicas, sendo identificados como aleucêmicos (AL); Grupo 3: cinco animais (17 quartos mamários) infectados pelo VLB manifestando linfocitose persistente (PL). As vacas infectadas com VLB foram classificadas manifestando PL quando suas contagens de linfócitos excederam $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ e suas contagens de leucócitos excederam $1,5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, conforme estabelecido por Thurmond et al. (1990).

Posteriormente, cada amostra foi codificada e randomizada, as análises foram realizadas de forma que o pesquisador não tinha conhecimento do status do VLB do animal do qual a amostra foi coletada. Esta pesquisa atendeu aos princípios éticos para a pesquisa animal e foi aprovada pela comissão de bioética.

Avaliação da viabilidade, capacidade fagocítica e a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio por macrófagos

Separação das Células do Leite

A separação das células do leite foi realizada conforme descrito por Blagitz et al. (2013). Resumidamente, foi realizada a diluição de 1 L de leite em 1 L de solução salina tamponada (PBS). Após a centrifugação a $1000 \times g$ por 15 min, a camada de gordura e o sobrenadante foi descartado. O pellet celular foi então lavado novamente com 30 mL de solução PBS e centrifugado a $400 \times g$ por 10 min. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo celular RPMI-1640 (R7638, Sigma Aldrich, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), e posteriormente, as células foram contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada através da exclusão utilizando o azul de Tripan. As células presentes no leite foram então diluídas com meio de cultivo celular contendo 10% de soro fetal bovino a uma concentração de $2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ de células viáveis.

Identificação dos macrófagos lácteos

Inicialmente, as células foram incubadas com 1 µL de anticorpo monoclonal (mAb) mouse IgG1 anti-bovine CD14 (nº cat. MM61A, VMRD Pullman, Pullman, EUA) por 30 min a temperatura ambiente. Logo após, 1 mL de PBS foi adicionado ao tubo específico de citometria, e as amostras centrifugadas a 400 x g por 8 min. Posteriormente, 1 µL de anticorpo secundário goat anti-mouse IgG1 conjugado ao aloficocianina (APC; nº cat. A10541, Invitrogen, Carlsbad, EUA) foi adicionado as amostras, que foram incubadas por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, 1 mL da solução PBS foi adicionada à suspensão celular, a qual foi centrifugada a 400x g por 8 min. Finalmente, 300 µL de PBS foi adicionado às amostras que foram analisadas por citômetro de fluxo (BD FACSCalibur, Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, EUA). Um controle negativo (não marcado), um controle empregando a marcação apenas com o anticorpo secundário, e amostra marcada apenas com o anticorpo foram preparadas para os controles da compensação.

Deteção da apoptose por citometria de fluxo

A apoptose de macrófagos lácteos residentes foi determinada pela marcação dupla com anticorpo anti-anexina-V conjugado com isotiociano de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídeo (PI) por análise de citometria de fluxo utilizando kit comercial (cat. n. K2350, APOPTTEST-FITC, Dako Cytometry, Holanda), conforme previamente descrito (Blagitz et al., 2015; Della Libera et al., 2015; Souza et al., 2020). Inicialmente, 2×10^5 células do leite foram ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM) contendo anticorpo anti-anexina-V FITC e incubados em temperatura ambiente por 20 min no escuro. Posteriormente, os macrófagos foram identificados usando mAb, conforme descrito acima. Imediatamente antes da análise de citometria de fluxo, 5 µL de uma solução de PI 250 µg mL⁻¹ foi adicionada. As células negativas para a anexina-V marcada com FITC e ao PI foram consideradas como vivas. As células que foram reativas à anexina V marcada com FITC, mas negativas para o PI, foram classificadas como apoptóticas. Aqui, 20.000 células, excluindo a maioria dos detritos, foram examinadas por amostra. O software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, EUA) foi usado para analisar os dados.

Preparação de Staphylococcus aureus marcados com iodeto de propídeo

A marcação dos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) com iodeto de propídeo (PI) foi preparado como proposto por Hasui et al. (1989) e modificado por Della Libera et al. (2015).

Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio

A produção intracelular de ERO foi realizado através da citometria de fluxo, conforme previamente descrito (Blagitz et al., 2015; Della Libera et al., 2015; Souza et al., 2020) utilizando o 2',7' dichlorofluorescein diacetate (DCFH2-DA) como sonda. Os vários tipos de ERO (peróxido de hidrogênio, peroxinitrito, óxido nítrico, radicais hidroxila e peroxil) oxidam o DCFH2-DA em DCF, que é fluorescente e pode ser detectado usando um citômetro de fluxo equipado com um conjunto de filtros padrão para fluoresceína verde (Shehat & Aranijuez-Tigno, 2019). Brevemente, 2×10^5 de células viáveis do leite foram incubadas com 200 μ L de DCFH2-DA (0.3 mM, cat. n. D6883, Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) por 30 min a 37 °C e 800 μ L de PBS. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de 3 mM de EDTA. Em seguida, os macrófagos foram identificados usando mAb, conforme descrito acima. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 400 x g por 10 min, os leucócitos foram ressuspensos em 300 μ L de PBS e analisados por citometria de fluxo.

Fagocitose

O ensaio de fagocitose foi realizado através da citometria de fluxo utilizando *S. aureus* conjugado com PI, conforme previamente descrito (Blagitz et al., 2015; Della Libera et al., 2015; Souza et al., 2020). Brevemente, 2×10^5 de células viáveis do leite foram incubadas com 100 μ L de *S. aureus* conjugado com PI por 30 min a 37 °C e 900 μ L de PBS. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de 3 mM de EDTA, para reduzir drasticamente o número de bactérias aderentes à membrana celular que poderiam ser consideradas erroneamente como fagocitadas (Batista et al., 2018). Em seguida, os macrófagos foram identificados usando mAb, conforme descrito acima. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 400x g por 10 min, os leucócitos foram ressuspensos em 300 μ L de PBS e analisados por citometria de fluxo.

No presente estudo, 20.000 células, excluindo a maioria dos debris celulares, foram examinadas por amostra. As leituras das amostras foram realizadas utilizando um citômetro de fluxo FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems™, San Diego, EUA) com lasers de argônio (excitação 488 nm) e diodo (excitação 635 nm). O software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, EUA) foi usado para analisar os dados. Os dados são apresentados como porcentagem de macrófagos (células CD14+) que produziram ERO (porcentagem de células fluorescentes) e a média geométrica da intensidade de fluorescência indica a intensidade de produção de ERO de cada célula dado pela mensuração da intensidade da fluorescência. Os resultados foram corrigidos para conteúdo de autofluorescência usando células de leite não marcadas das amostras de leite do mesmo quarto mamário.

Análise estatística

As distribuições de todas as variáveis foram analisadas usando gráficos de probabilidade normais obtidos por meio dos testes de Shapiro e Wilk. Os dados foram analisados por meio de análises de variância multivariada. Em seguida, foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Considerou-se o modelo de quartos mamários e as vacas aninhados dentro de vacas. As análises estatísticas foram realizadas com o software estatístico STATA versão 12 (Stata Corp., College Station, Texas, USA). Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro-padrão. O nível de significância foi definido em $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

Os valores de CCS, dias em lactação e parto (dados não apresentados) não diferiram entre os grupos. No entanto, amostras de leite de vacas sorologicamente positivas para VLB manifestando PL apresentaram maior porcentagem de macrófagos (CD14⁺) do que aquelas provenientes de vacas soronegativas para o VLB ($P = 0,01$; Fig 1). Como resultado, foi observada uma tendência a maior porcentagem de macrófagos lácteos em amostras de animais infectados pelo VLB manifestando PL quando comparados com animais AL ($P = 0,052$; Fig. 1).

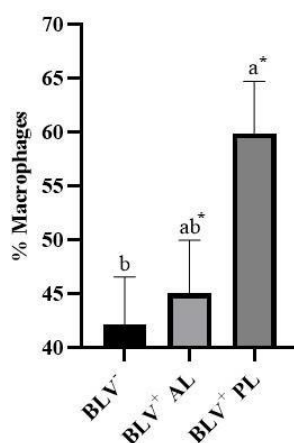


Figure 1. Porcentagem (média $\pm$ erro-padrão) de macrófagos lácteos (CD14⁺) de glândulas mamárias sadias em animais soronegativos (VLB⁻) e infectados pelo vírus da leucemia bovina (VLB⁺) aleucêmicos (AL) e manifestando linfocitose persistente (PL). Letras diferentes indicam $P \leq 0,05$. * $P = 0,052$.

No presente estudo, a porcentagem de macrófagos lácteos que fagocitaram *S. aureus* em animais soronegativos foi maior que em vacas leiteiras infectadas pelo VLB AL ($P = 0,004$, Fig. 2) e manifestando PL ($P = 0,018$; Fig. 2). No entanto, a porcentagem de macrófagos lácteos que produziram ERO ($P = 0,22$) e a intensidade de fagocitose ($P = 0,79$) e produção de ERO ($P = 0,14$) não diferiu entre os grupos.

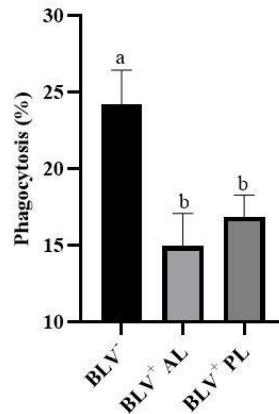


Figure 2. Porcentagem (média $\pm$ erro-padrão) de macrófagos lácteos que fagocitaram *S. aureus* em animais soronegativos (VLB⁻) e infectados pelo vírus da leucemia bovina (VLB⁺) aleucêmicos (AL) e manifestando linfocitose persistente (PL). Letras diferentes indicam $P \leq 0,05$.

Os animais infectados pelo VLB aleucêmicos ($P = 0,0005$) e com PL ($P = 0,0009$) apresentaram maior porcentagem de macrófagos lácteos viáveis, enquanto animais sadios apresentaram maior porcentagem de macrófagos lácteos apoptóticos que animais infectados pelo VLB aleucêmicos ($P \leq 0,0001$) e com LP ($P \leq 0,0001$).

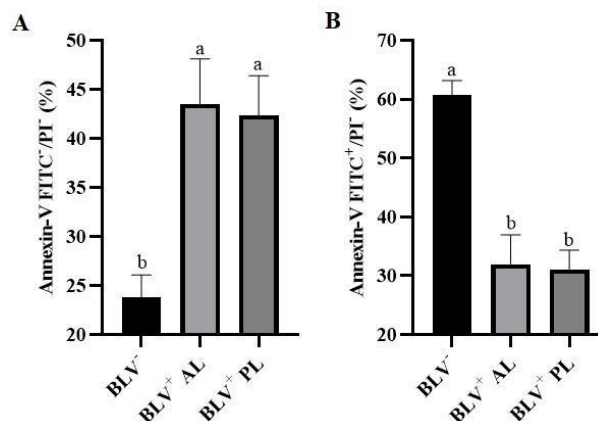


Figure 3. Porcentagem (média $\pm$ erro-padrão) de macrófagos lácteos viáveis (Annexin-V⁻/PI⁻) (A) e em apoptose (Annexin-V⁺/PI⁺) (B) em animais soronegativos (VLB⁻) e infectados pelo vírus da leucemia bovina (VLB⁺) aleucêmicos (AL) e manifestando linfocitose persistente (PL). Letras diferentes indicam $P \leq 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Apesar da maioria das pesquisas com VLB demonstrarem seu impacto no sistema imune adaptativo, algumas pesquisas evidenciam que a infecção por VLB afeta negativamente o desempenho de monócitos e macrófagos (Frie & Coussens, 2015), no entanto, até onde se sabe, nenhum estudo investigou o impacto da infecção pelo VLB na função de macrófagos lácteos. Os macrófagos representam a principal população leucocitária no leite de glândulas mamárias de vacas sadias (Sarıkaya et al., 2004), sendo, portanto, os primeiros a encontrar possíveis patógenos invasores. Os macrófagos desempenham papel importante na defesa da glândula mamária, que dentre várias funções, atuam em mecanismos de fagocitose, apresentação de antígenos, síntese de lactoferrina, fatores do sistema complemento, N-acetil- β -D-glucosamidase, citocinas, além de remover debris celulares e neutrófilos apoptóticos (Johnston, 1988; Carneiro et al., 2009; Bastos et al., 2012).

No presente estudo, observou-se um maior percentual de macrófagos lácteos (CD14⁺) em animais com PL em relação aos animais sorologicamente negativos e AL. Portanto, hipotetizamos que o maior percentual de macrófagos presentes no leite de animais infectados por VLB com PL pode estar associado, pelo menos em parte, à expressão dos genes *Bcl-2* e *Bcl2L1* que estão envolvidos na inibição apoptótica (Erskine et al., 2012). Embora até então não se saiba com exatidão como o VLB altera os mecanismos de crescimento celular e seus distúrbios proliferativos, há evidências que sugerem que o VLB pode afetar vias de sinalização de crescimento e morte celular (Frie & Coussens, 2015). Convém destacar que todos os animais infectados pelo VLB manifestando PL apresentaram alta carga proviral, enquanto cerca de 70% dos animais AL apresentaram baixa carga proviral, o que pode explicar a maior inibição da apoptose em animais infectados pelo VLB.

manifestando PL. Portanto, estudos futuros para determinar a carga proviral em bovinos com PL e AL são bem-vindos.

Além disto, os macrófagos lácteos em vacas leiteiras infectadas pelo VLB apresentaram menores percentuais de fagocitose de *S. aureus* que animais soronegativos para VLB. Similarmente, Blagitz et al. (2017) observaram em seu estudo a redução no percentual de fagocitose de *S. aureus* por monócitos sanguíneo em vacas infectadas com VLB que apresentavam PL. Ademais, Azedo et al. (2011) demonstraram que monócitos de fêmeas bovinas com PL manifestaram menor índice de fagocitose do que fêmeas soronegativas e aleucêmicas. Portanto, apesar da infecção do VLB impactar a capacidade fagocítica de monócitos sanguíneos apenas em animais manifestando PL, nossos achados demonstraram que a função de macrófagos lácteos é prejudicada em animais infectados pelo VLB independente da manifestação da PL.

Portanto, apesar do número limitado de animais utilizados no presente estudo, nossos achados demonstram que a infecção por VLB pode afetar negativamente a imunidade da glândula mamária. Diante disto, fica claro que a infecção por VLB pode impactar na ação e função de macrófagos frente a patógenos causadores da mastite, podendo favorecer a susceptibilidade à infecções ou diminuir a sua capacidade de eliminar a infecção intramamária (cura espontânea). Assim, acreditamos que o VLB pode afetar programas de controle da mastite em rebanhos leiteiros.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo fornece informações importantes sobre as implicações das infecções por VLB na glândula mamária, impactando a funcionalidade dos macrófagos lácteos em animais infectados pelo VLB, principalmente aqueles que apresentam PL. Além disso, esta pesquisa destaca a importância do controle de infecções pelo VLB, devido aos seus efeitos indiretos no surgimento de infecções secundárias, como por exemplo a mastite.

REFERÊNCIAS

- AZEDO, M. R. *et al.* Avaliação funcional de monócitos de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose bovina. **Arq. Bras. Vet. Zoot.** v. 63, p. 1131-1140, 2011.
- Bastos, CR, Blagitz, MG, Souza, FN, Batista, CF, Stricagnolo, CR, Azedo, MR, Della Libera, AMMP, 2012. Viabilidade celular, fagocitose e espraçamento de fagócitos mononucleares, e liberação de peróxido de hidrogênio por leucócitos de glândulas mamárias bovina sadias e infectadas. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 850-854.
- Batista, CF, Souza, FN, Santos, KR, Ramos Sanchez, EM, Reis, LC, Bertagnon, HG, Blagitz, MG, Gomes, RC, Lage, AP, Heinemann, MB, Della Libera, AMMP, 2018. R-Phycoerythrin-labeled *Mannheimia haemolytica* for the simultaneous measurement of phagocytosis and intracellular reactive oxygen species production in bovine blood and bronchoalveolar lavage cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 196, 53-59.
- Blagitz, MG, Souza, FN, Batista, CF, Azevedo, LF, Benites, NR, Melville, PA, Diniz, SA, Silva, MX, Haddad, JPA, Heinnemann, MB, Cerqueira, MMOP, Della Libera, AMMP, 2015. The neutrophil function and lymphocyte profile of milk from bovine mammary glands infected with *Streptococcus dysgalactiae*. *J. Dairy Res.* 82, 460-469.
- BLAGITZ, M. G. *et al.* Immunological implications of bovine leukemia virus infection. **Research in Veterinary Science.** v. 114, p. 109-116, 2017.
- Blagitz, MG, Souza, FN, Santos, BP, Batista, CF, Parra, AC, Azevedo, LFF, Melville, PA, Benites, NR, Della Libera, AMMP, 2013. Function of milk polymorphonuclear neutrophils leukocytes in bovine mammary glands infected with *Corynebacterium bovis*. *J. Dairy. Sci.* 96, 3750-3757.
- Carneiro, DMVF, Domingues, PF, Vaz, AK, 2009. Imunidade inata da glândula mamária bovina: resposta à infecção. *Ciência Rural.* 39, 1934-1943.

- CUESTA, L. M. *et al.* Effect of bovine leukemia virus (BLV) infection on bovine mammary epithelial cells RNA-seq transcriptome profile. **Plos One**. v. 15, p. 1-12, 2020.
- CUESTA, L. M. *et al.* Stable infection of a bovine mammary epithelial cell line (MAC-T) with bovine leukemia virus (BLV). **Virus Res.** v. 256, p. 11-16, 2018.
- CUESTA, L. M. *et al.* Effect of bovine leukemia virus on bovine mammary epithelial cell. **Virus Res.** v. 271, p. 1976-1978, 2019.
- Da, Y, Shanks, RD, Stewart, JA, Lewin, HA, 1993. Milk and fat yields decline in bovine leucemia virus-infected Holstein cattle with persistente lymphocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90, 6538-6541.
- DELLA LIBERA, A. M. M. P. *et al.* Quantification of B cells and T lymphocytes subsets in bovine leucemia virus infected dairy cows. **Semina. Cien. Agrar.** v. 33, p. 1487-1494, 2012.
- DELLA LIBERA, A. M. M. P. *et al.* Effects of bovine leucemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. **Vet. Res.** v. 46, 2, 2015.
- Denis, M, Parlane, NA, Lacy-Hulbert, SJ, Summers, EL, Buddle, BM, Wedlock, DN, 2006. Bactericidal activity of macrophages against *Streptococcus uberis* is diferente in mammary gland secretions of lactating and drying off cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114, 111- 120.
- Divers, TJ, Peek, SF, 2008. *Rebhunn's diseases of catlle*, Elsevier, 704 pp.
- EMANUELSON, U.; SCHERLING, K.; PETTERSON, H. Relationship between herd bovine leucemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds. **Prev. Vet. Med.** v. 12, p. 121-131, 1992.
- Erskine, RJ, Bartlett, PC, Byrem, TM, Render, CL, Febvay, C, Houseman, JT, 2012. Association between bovine leucemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J. Dairy. Sci.* 95, 727-734.

- Frie, MC, Coussens, PM, 2015. Bovine leukemia virus: A major threat to proper immune responses in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 163, 103-114.
- GILLET, N. *et al.* Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. ***Retrovirology***. v. 4, 18, 2007.
- Hasui, M, Hirabayashi, Y, Kobayashi, Y, 1989. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. *J. Immunol. Methods.* 117, 53-58.
- Johnston Jr, RB, 1988. Monocytes and macrophages. *N. Engl. J. Med.* 318, 747-752.
- Juliarena, MA, Gutierrez, SE, Ceriani, C, 2007. Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. *Am. J. Vet. Res.* 68, 1220-1225.
- LEE, C. S.; WOODING, F. B.; KEMP, P. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cow secretion, colostrum and milk from normal cows. ***J. Dairy. Res.*** v. 47, p. 39-50, 1980.
- MERLE, R.; SCHRÖDER, A.; HAMANN, J. Cell function in bovine mammary gland: a preliminary study on the interdependence of healthy and infected udder quarters. ***J. Dairy. Res.*** v. 74, p. 174-179, 2007.
- MILLER, R. H.; PAAPE, M. J.; FULTON, L. A. Variation in milk somatic cells of heifers at first calving. ***J. Dairy. Sci.*** v. 74, p. 3789-3790, 1991.
- NIETO FARIAS, M. V. *et al.* Lymphocyte proliferation and apoptosis of lymphocyte subpopulations in bovine leukemia virus-infected dairy cows with high and low proviral load. ***Vet. Immunol. Immunopathol.*** v. 206, p. 41-48, 2018.
- NORBY, B.; BARTLETT, P. C.; BYREM, T. M, ERSKINE, R. J. Effect of infection with bovine leukemia virus on milk production in Michigan dairy cows. ***J. Dairy. Sci.*** v. 99, p. 1-10, 2015.

- Oliver, SP, González RN, Hogan, JS, Jayarao, BM, Owens, WE, 2004. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. In: Verona. National Mastitis Council.
- Piepers, S, De Meulemeester, L, de Kruif, A, Opsomer, G, Barkema, HW, De Vlieghe, S, 2007. Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J. Dairy. Res.* 74, 478-483.
- Piepers, S, De Vlieghe, S, 2013. Oral supplementation of medium chain fatty acids during the dry period supports the neutrophil viability of peripartum dairy cows. *J. Dairy. Res.* 80, 309-318.
- RADEMACHER, R.; SODOMKOVA, D.; VANASEK, J. Alkaline phosphatase in neutrophil granulocytes of the peripheral blood of healthy and leukotic cattle. **Vet. Med.** v. 22, p. 673-677, 1997.
- RINALDI, M.; LI, R. W.; CAPUCO, A. V. Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 138, p. 267-279, 2010.
- Sandev, N, Koleva, M, Binev, R, Ilieva, D, 2004. Influence of enzootic bovine leukosis virus upon the incidence of subclinical mastitis in cow at a different stage of infection. *Vet. Arhiv.* 74, 411-416.
- SARIKAYA, H. *et al.* Differentiation of leukocytes in bovine milk. **Milchwissenschaft.** v. 59, p. 586-589, 2004.
- SARIKAYA, H. *et al.* Distribution of leucocyte populations, milk composition, in milk fractions of healthy quarters in dairy cows. **J. Dairy. Res.** v. 72, p. 486-492, 2005.
- SCHWARTZ-CORNIL, I. *et al.* Bovine leukaemia virus-induced lymphocytosis in sheep is associated with reduction of spontaneous B cell apoptosis. **J. Gen. Virol.** v. 78, p. 153-162, 1997.

- Shehat, MG, Tigno-Aranjuez, J, 2019. Flow Cytometric Measurement of ROS Production in Macrophages in Response to FcγR Cross-linking. *JoVE*. 145.
- Solovjov, DA, Pluskota, E, Plow, EF, 2005. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J. Biol. Chem.* 280, 1336-1345.
- Souza, FN, Blagitz, MG, Batista, CF, Takano, PV, Gargano, RG, Diniz, SA, Silva, MX, Ferronato, JA, Santos, KR, Heinemann, MB, De Vlieghe, S, Della Libera, AMMP, 2020. Immune response in nonspecific mastitis: what can it tell us?. *J. Dairy Sci.* 103, 5376-5386.
- SOUZA, F. N. *et al.* Intracellular Reactive Oxygen Species Production by Polymorphonuclear Leukocytes in Bovine Leukemia Virus-Infected Dairy Cow. **J. Vet. Sci.** v. 74, p. 221-225, 2012.
- Souza, FN, Latorre, AO, Caniceiro, BD, Sakai, M, Kieling, K, Blagitz, MG, Della Libera, AMMP, 2011. Apoptosis of CD5⁺ cells and lymphocyte proliferation in bovine leukemia virus-infected dairy cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 63, 1124-1130.
- SUZUKI, S. *et al.* Expression analysis of Foxp3 in T cells from bovine leukemia virus infected cattle. **Microbiol. Immunol.** v. 57, p. 600-604, 2013.
- TAKANO, P. V. *et al.* Estudo comparativo das diferentes técnicas empregadas na contagem diferencial de leucócitos no leite. **Pesq. Vet. Bras.** v. 38, p. 773-778, 2018.
- Thurmond, MC, Carter, RL, Picanso, JP, Stralka, K, 1990. Upper-normal prediction limits of lymphocyte counts for cattle not infected with bovine leukemia virus. *Am. Vet. Res.* 51, 466-470.

ANEXO 1 – NORMAS DA REVISTA VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY

Tipos de contribuições

1. Artigos de pesquisa originais (artigos completos e comunicações curtas);
2. Artigos de revisão (mini-revisões e artigos de revisão completos);
3. Relatórios de reuniões científicas.

Artigos de pesquisa originais:

Devem relatar os resultados de pesquisas originais. O material não deve ter sido publicado anteriormente em outro lugar, exceto em uma forma preliminar.

Os artigos completos devem obedecer ao formato tradicional com títulos para a seção Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão.

Uma breve comunicação (Short Communication) é uma descrição concisa, mas completa de uma investigação limitada, que não será incluída em um artigo posterior. As comunicações curtas devem ser completamente documentadas, tanto por referência à literatura quanto pela descrição dos procedimentos experimentais empregados, como um artigo regular. Não devem ocupar mais de 6 páginas impressas com figuras, tabelas e referências (cerca de 12 páginas do manuscrito, incluindo um total de 4 figuras e tabelas) e devem conter um Resumo de não mais de 200 palavras. Os títulos devem ser Introdução, Materiais e Métodos com os Resultados e Discussão combinados. A contagem máxima total de palavras de texto nessas seções é 3000.

Artigos contendo dados de sequência per se estão fora do escopo do periódico, mas aqueles que descrevem sequências incluindo utilidade, por exemplo, a expressão e função imunológica de uma molécula ou a geração de mAb útil, serão considerados. Os dados de sequência podem ser enviados para inclusão como informação suplementar com os números de acesso citados no texto.

Lista de verificação de submissão

Você pode usar esta lista para fazer uma verificação final de sua submissão antes de enviá-la para a revista para revisão. Por favor, verifique a seção relevante neste Guia para Autores para mais detalhes.

Certifique-se de que os seguintes itens estejam presentes:

Um autor foi designado como o autor para correspondência com os dados de contato:

- Endereço de e-mail;
- Endereço postal completo.

Todos os arquivos necessários foram carregados:

Manuscrito:

- Inclua palavras-chave;
 - Todas as figuras (inclua legendas relevantes);
 - Todas as tabelas (incluindo títulos, descrição, notas de rodapé);
 - Certifique-se de que todas as citações de figuras e tabelas no texto correspondam aos arquivos fornecidos;
 - Indique claramente se são coloridas deve ser usado para quaisquer figuras em arquivos impressos de resumos gráficos / realces (quando aplicável);
- Arquivos suplementares (quando aplicável).

Considerações adicionais:

- O manuscrito foi 'verificado a ortografia' e 'a gramática';
- Todas as referências mencionadas na Lista de Referências são citadas no texto e vice-versa;
- Foi obtida permissão para o uso de material protegido por direitos autorais de outras fontes (incluindo a Internet);
- Uma declaração de interesses concorrentes é fornecida, mesmo se os autores não tiverem interesses concorrentes a declarar;
- As políticas do periódico detalhadas neste guia foram revisadas;

- Sugestões de árbitros e detalhes de contato fornecidos, com base nos requisitos do periódico.

Introdução

Indique os objetivos do trabalho e forneça uma fundamentação adequada, evitando o levantamento detalhado da literatura ou a síntese dos resultados.

Material e métodos

Forneça detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido por um pesquisador independente. Os métodos já publicados devem ser resumidos e indicados por uma referência. Se estiver citando diretamente de um método publicado anteriormente, use aspas e também cite a fonte. Quaisquer modificações nos métodos existentes também devem ser descritas.

Resultados

Os resultados devem ser claros e concisos.

Discussão

Deve explorar o significado dos resultados do trabalho, não repeti-los. Uma seção combinada de Resultados e Discussão costuma ser apropriada. Evite citações extensas e discussão da literatura publicada.

Conclusões

As principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma breve seção de Conclusões, que pode ser isolada ou formar uma subseção de uma seção de Discussão ou Resultados e Discussão.

Informações essenciais da página de título

• Título

Conciso e informativo. Os títulos são frequentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.

• **Nomes e afiliações dos autores.**

Indique claramente o (s) nome (s) e sobrenome (s) de cada autor e verifique se todos os nomes foram digitados corretamente. Você pode adicionar seu nome entre parênteses em seu próprio script por trás da transliteração em inglês. Apresente os endereços de afiliação dos autores (onde o trabalho real foi feito) abaixo dos nomes. Indique todas as afiliações com uma letra sobrescrita minúscula imediatamente após o nome do autor e na frente do endereço apropriado. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.

• **Autor para correspondência.**

Indique claramente quem irá lidar com a correspondência em todas as fases de avaliação e publicação, também após a publicação. Essa responsabilidade inclui responder a quaisquer dúvidas futuras sobre Metodologia e Materiais. Certifique-se de que o endereço de e-mail seja fornecido e que os dados de contato sejam mantidos atualizados pelo autor correspondente.

• **Endereço atual / permanente.**

Se um autor mudou desde que o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava visitando na época, um 'endereço atual' (ou 'endereço permanente') pode ser indicado como uma nota de rodapé ao nome desse autor. O endereço no qual o autor realmente fez o trabalho deve ser mantido como o endereço de afiliação principal. Números arábicos sobrescritos são usados para essas notas de rodapé.

Formatos

Se sua arte eletrônica for criada em um aplicativo do Microsoft Office (Word, PowerPoint, Excel), forneça "no estado em que se encontra" no formato de documento nativo.

Independentemente do aplicativo usado diferente do Microsoft Office, quando sua arte eletrônica for finalizada, 'Salvar como' ou converta as imagens em um dos seguintes formatos (observe os requisitos de resolução para desenhos de linhas, meios-tons e combinações de linha / meio-tom fornecidos abaixo):

EPS (ou PDF): Desenhos vetoriais, incorpora todas as fontes usadas.

TIFF (ou JPEG): Fotografias coloridas ou em escala de cinza (meios-tons), com um mínimo de 300 dpi.

TIFF (ou JPEG): Desenhos de linha em bitmap (pixels puros em preto e branco), com um mínimo de 1000 dpi.

TIFF (ou JPEG): Combinações de linha de bitmap / meio-tom (colorido ou tons de cinza), mantendo um mínimo de 500 dpi.

Não:

- Forneça arquivos otimizados para uso na tela (por exemplo, GIF, BMP, PICT, WPG); eles normalmente têm um número baixo de pixels e um conjunto limitado de cores;
- Forneça arquivos com resolução muito baixa;
- Envie gráficos desproporcionalmente grandes para o conteúdo.

Legendas das figuras

Certifique-se de que cada ilustração tenha uma legenda. Forneça as legendas separadamente, não anexadas à figura. A legenda deve conter um breve título (não na própria figura) e uma descrição da ilustração. Reduza o texto nas próprias ilustrações, mas explique todos os símbolos e abreviações usados.

Referências:

Citação no texto

Certifique-se de que todas as referências citadas no texto também estão presentes na lista de referências (e vice-versa). Quaisquer referências citadas no resumo devem ser fornecidas por extenso. Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendados na lista de referências, mas podem ser mencionados no texto. Se essas referências estiverem incluídas na lista de referências, elas devem seguir o estilo de referência padrão da revista e devem incluir uma substituição da data de publicação por 'Resultados não publicados' ou 'Comunicação pessoal'. A citação de uma referência como 'no prelo' implica que o item foi aceito para publicação.

Links de referência

Maior descoberta de pesquisas e revisão por pares de alta qualidade são garantidas por links online para as fontes citadas. Para nos permitir criar links para serviços de abstração e indexação, como Scopus, CrossRef e PubMed, certifique-se de que os dados fornecidos nas referências estão corretos. Observe que sobrenomes, títulos de periódicos / livros, ano de publicação e paginação incorretos podem impedir a criação de links. Ao copiar referências, tenha cuidado, pois elas já podem conter erros. O uso do DOI é altamente encorajado.

Um DOI tem garantia de nunca mudar, então você pode usá-lo como um link permanente para qualquer artigo eletrônico. Um exemplo de citação usando DOI para um artigo que ainda não foi publicado é: VanDecar JC, Russo RM, James DE, Ambeh WB, Franke M. (2003). Continuação asísmica da laje das Pequenas Antilhas abaixo do nordeste da Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Observe que o formato de tais citações deve ser no mesmo estilo que todas as outras referências no artigo.

Referências da Web

No mínimo, o URL completo deve ser fornecido e a data em que a referência foi acessada pela última vez. Quaisquer informações adicionais, se conhecidas (DOI, nomes dos autores, datas, referência a uma publicação fonte, etc.), também devem ser fornecidas. As referências da Web podem ser listadas separadamente (por exemplo, após a lista de referências) sob um título diferente, se desejado, ou podem ser incluídas na lista de referências.

Referências de dados

Este periódico incentiva você a citar conjuntos de dados subjacentes ou relevantes em seu manuscrito, citando-os em seu texto e incluindo uma referência de dados em sua Lista de referências. As referências de dados devem incluir os seguintes elementos: nome (s) do autor, título do conjunto de dados, repositório de dados, versão (quando disponível), ano e identificador persistente global. Adicione [dataset] imediatamente antes da referência para que possamos identificá-lo corretamente como uma referência de dados. O identificador [dataset] não aparecerá em seu artigo publicado.

Referências em uma edição especial

Certifique-se de que as palavras 'esta edição' sejam adicionadas a quaisquer referências na lista (e quaisquer citações no texto) para outros artigos na mesma edição especial.

Estilo de Referência

1. Todas as publicações citadas no texto devem ser apresentadas em uma lista de referências após o texto do manuscrito. O manuscrito deve ser verificado cuidadosamente para garantir que a grafia dos nomes e datas dos autores sejam exatamente iguais no texto e na lista de referências.

2. No texto, referir o nome do autor (sem inicial) e ano de publicação, seguido - se necessário - de uma breve referência às páginas apropriadas. Exemplos: "Desde Peterson (1988) mostrou que ..." "Isso está de acordo com os resultados obtidos posteriormente (Kramer, 1989, pp. 12-16)".

3. Se for feita referência no texto a uma publicação escrita por mais de dois autores, deve-se usar o nome do primeiro autor seguido de "et al.". Essa indicação, entretanto, nunca deve ser usada na lista de referências. Nesta lista, devem ser mencionados os nomes do primeiro autor e dos co-autores.

4. As referências citadas em conjunto no texto devem ser organizadas cronologicamente. A lista de referências deve ser organizada em ordem alfabética pelos nomes dos autores e cronologicamente por autor. Se o nome de um autor na lista também for citado com co-autores, a seguinte ordem deve ser usada: publicações de um único autor, organizadas de acordo com as datas de publicação - publicações do mesmo autor com um co- autor - publicações do mesmo autor com mais de um co-autor. Publicações do (s) mesmo (s) autor (es) no mesmo ano devem ser listadas como 1974a, 1974b, etc.

5. Use o seguinte sistema para organizar suas referências:

a. Para periódicos

Harp, JA, Walters, TE, Goff, JP, 2004. Lymphocyte subsets and adhesion molecule expression in milk and blood of periparturient dairy cattle. Vet. Immunol. Immunopathol. 102, 9-17.

b. Para simpósios editados, números especiais, etc., publicados em um periódico

Miller, LC, Fox, JM, 2004. Apoptose e vírus da síndrome respiratória e reprodutiva porcina. Em: Murtaugh, MP, Rowland, RRR (Eds), Immunology and Immunopathology of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS). Vet. Immunol. Immunopathol. 102, 131-142.

c. Para livros

Gershwin, M., Naguwa, S., 2005. Allergy and Immunology Secrets, Elsevier, 352 pp.

D. Para livros de vários autores

Butler, JE, 1981. Um conceito de imunidade humoral entre ruminantes e uma abordagem para sua investigação. Em: Butler, JE, Nielson, K., Duncan, JR (Eds.), The Ruminant Immune System, Plenum Press, New York, pp. 3-55.

Referências de dados [conjunto de dados] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Dados de mortalidade para a doença da murcha do carvalho japonês e composições da floresta circundante. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

6. Abrevie os títulos dos periódicos mencionados na lista de referências de acordo com BIOSIS Serial Sources, publicada anualmente pelo BIOSIS. A abreviatura correta para este periódico é Vet. Immunol. Immunopathol.

7. No caso de publicações em qualquer idioma diferente do inglês, o título original deve ser mantido. No entanto, os títulos das publicações em alfabetos não latinos devem ser transliterados e uma notação como "(em russo)" ou "(em grego, com resumo em inglês)" deve ser adicionada.

8. Trabalhos aceitos para publicação, mas ainda não publicados, devem ser referidos como "no prelo".

9. As referências relativas a dados não publicados e "comunicações pessoais" não devem ser citadas na lista de referências, mas podem ser mencionadas no texto.

10. Podem ser fornecidas referências da Web. No mínimo, o URL completo é necessário. Quaisquer informações adicionais, como nomes de autores, datas, referência a uma publicação fonte e assim por diante, também devem ser fornecidas.

11. Os artigos disponíveis online, mas sem número de volume e página, podem ser consultados por meio de seu código Digital Object identifier (DOI).

Informação adicional

1. Os manuscritos devem ter linhas numeradas com margens largas e espaçamento duplo, ou seja, também para resumos, notas de rodapé e referências. Todas as páginas do manuscrito devem ser numeradas. No entanto, no texto, nenhuma referência deve ser feita aos números das páginas; se necessário, pode-se consultar as seções. Evite o uso excessivo de itálico para enfatizar parte do texto.
2. Os manuscritos em geral devem ser organizados na seguinte ordem:
 - Título (deve ser claro, descritivo e não muito longo);
 - Nome (s) do (s) autor (es);
 - Endereços postais completos das afiliações;

- Números completos de telefone e fax e endereço de e-mail do autor para correspondência;
 - Apresentar endereço (s) do (s) autor (es), se aplicável;
 - Endereço de correspondência completo, incluindo endereço de e-mail para o qual as provas devem ser enviadas;
 - Abstract;
 - Palavras-chave (termos de indexação), normalmente de 3 a 6 itens;
 - Introdução;
 - Métodos, técnicas;
 - Resultados;
 - Discussão;
 - Conclusão;
 - Agradecimentos e quaisquer informações adicionais sobre bolsas de pesquisa, etc;
 - Referências;
 - Mesas;
 - Legendas de figuras;
 - Tabelas (arquivo (s) separado (s));
 - Figuras (arquivo (s) separado (s)).
3. Títulos e subtítulos não devem ser executados dentro do texto. Eles devem ser digitados em uma linha separada, sem recuo. Use o tipo de letra minúscula.
 4. Devem ser usadas unidades SI.
 5. A Elsevier reserva-se o privilégio de retornar ao autor para revisão de manuscritos e ilustrações aceitos que não estejam na forma adequada fornecida neste guia.

<https://www.elsevier.com/journals/veterinary-immunology-and-immunopathology/0165-2427/guide-for-authors>.