TATIANA DE REZENDE SPINOLA

*Correlação entre a atipia linfocitária e o perfil imunológico de animais infectados pelo
Vírus da Leucose Enzoótica Bovina*

São Paulo

2010

TATIANA DE REZENDE SPINOLA

Correlação entre a atipia linfocitária e o perfil imunológico de animais infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina

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

Departamento:
Clínica Médica

Área de Concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2319
FMVZ

Spinola, Tatiana de Rezende

Correlação entre a atipia linfocitária e o perfil imunológico de animais infectados
pelo vírus da leucose enzoótica bovina / Tatiana de Rezende Spinola. -- 2010.
84 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera.

1. Linfócito. 2. Atipias linfocitárias. 3. Leucose Enzoótica Bovina. 4. Bovinos.
I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SPINOLA, Tatiana de Rezende

Título: Correlação entre a atipia linfocitária e o perfil imunológico de animais infectados pelo Vírus da Leucose Enzoótica Bovina

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____
Prof. Dr	_____	Instituição:	_____
Assinatura:	_____	Julgamento:	_____

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Correlação da atipia linfocitária com o perfil imunológico de animais infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina", protocolado sob o nº 1895/2010, utilizando 200 (duzentos) bovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 07/04/2010.

We certify that the Research "Correlating of abnormal lymphocytes with immunologic profiles of animals infected with viral Leukosis", protocol number 1895/2010, utilizing 200 (two hundred) bovine, under the responsibility Profa. Dra. Alice Maria Melville Paiva Della Libera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/07/2010.

São Paulo, 08 de abril de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

DEDICATÓRIA

Ao meu marido (Dennys Barreira Marchi), que nunca me deixou desistir, quando tudo parecia perdido; que sempre me levantou quando estava por baixo, e que me ensinou que ninguém pode dizer que não sou capaz. Te amo.

A minha Tia (Laíz Cruz Pinheiro Bressane), pelo amor, conselhos, ajuda, confiança e dedicação, durante toda a minha vida serei grata.

A minha “mãe” Rita de Cássia Barreira, pelos ensinamentos, dedicação, conselhos e acima de tudo amor, obrigada por fazer parte da minha vida.

À minha afilhada (Ana Luíza de Rezende Spínola Amaral), quem amo muito, obrigada por existir.

Ao meu avô Plínio (in memoriam), sem ele nada seria possível, estive junto desde o começo.

AGRADECIMENTOS

Em especial ao **Prof. Dr. Wanderley Pereira de Araújo** (*in memoriam*), que mesmo lutando, acreditou e se dedicou. Tenho certeza que em todas as etapas desta dissertação esteve presente, com tamanha felicidade e orgulho. E aonde quer que ele esteja, estará com ar de missão cumprida.

À **Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera**, que sempre me aconselhou, às vezes com palavras doces e às vezes com puxões de orelha, como se fosse uma mãe. Obrigada por não desistir de mim e sempre estar por perto para ajudar no que for necessário.

À minha querida amiga, **Bárbara Gabriela Soares Sanches**, pela dedicação e ajuda na confecção desta dissertação, sem você nada seria possível. Não esperava uma atitude que nem a sua, amigos não estão presentes só em momentos bons e sim sempre. Desde já agradeço e pode ter certeza que está no meu coração.

Ao amigo, **Fernando Nogueira de Souza**, pelo incentivo e ajuda amizade a qual levarei para sempre.

Ao amigo, **Milton Ricardo Azedo**, uma pessoa séria, dedicado, amigo, sempre vou lhe dizer obrigada. Principalmente pelos conselhos e pela sua disposição em ajudar e esclarecer dúvidas. Amigo, te desejo sempre tudo de bom e que sempre alcance seus objetivos e sonhos.

À **Maiara Garcia Blagitz** e **Camila Freitas Batista**, pela agradável convivência e ajuda na elaboração da dissertação. Vocês sempre serão lembradas com muito carinho. Obrigada.

À todos os Professores Doutores do Departamento de Clínica Médica, em especial aos Professores: **Fernando José Benesi**, que não poupou esforços nos seus ensinamentos, sendo essencial na elaboração desta dissertação; à **Maria Cláudia Araripe Sucupira**, que mesmo tendo convivido muito pouco, sempre me contagiou com sua alegria.

Às amigas e técnicas dos laboratórios: **Clara S. Mori**, **Marly E.F. De Castro**, **Carmem S. Ribeiro**, sempre dispostas a ajudar, com sorrisos e palavras amigas, a vocês agradeço.

Principalmente á **Cláudia Regina Stricagnolo**, técnica do Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, sempre amiga, prestativa, atenciosa, dedicada, meu muito Obrigada.

Aos demais pós-graduandos do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, em especial, Alessandra Silva Lima, Aline Santana da Hora, Andrea Cristina Parra, Antônio Humberto Hamad Minervino, Bruno Marques Teixeira, Camila Domingues de Oliveira, Carolina Akiko Sato Cabral de Araújo, Cynthia Cristina Venâncio, Daniela Passarelli, Daniele Yuri Massukado R. Silva, Elizabeth Bohland, Fernanda Cavallini Cyrillo, Frederico Augusto Mazzocca Lopes Rodrigues, Enoch Brandão de Meira Souza Junior, Laura Cristina Henriques, Marjorie Yumi Hasegawa, Priscilla Marques do Nascimento, Raquel Fraga e Silva Raimundo, Thales dos Anjos de Faria Vechiato e Vanessa Storillo pelo apoio e agradável convivência.

.Á minha **Família**, (Liz Cruz Pinheiro de Rezende, Lisana Pinheiro de Rezende, Ricardo Tito Escórcio Marques Spinola, Adriana de Rezende Spinola, Juliana de Rezende Spinola, Rodrigo de Rezende Spinola, Orlando Marques de Rezende Spinola, Lizete Pinheiro Pedroso, Denise Pinheiro Pedroso, Davi Pedroso e Benedita Soares de Oliveira), sem vocês nada seria possível. Meu Obrigada sempre.

A **Deus**, quero agradecer todas as vitórias e dificuldades, pois nada acontece sem que ELE permita e é nas dificuldades que levantamos cada vez mais fortes para as vitórias.

RESUMO

SPINOLA, T. R. **Correlação entre a atipia linfocitária e o perfil imunológico de animais infectados pelo Vírus da Leucose Enzoótica Bovina.** [Correlation between immunological profile and atypical lymphocytes in bovine leukemia virus infected dairy cows]. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Dentre as enfermidades que causam alterações hematológicas em bovinos podemos citar a leucose enzoótica bovina (LEB). Podendo em alguns animais, determinar formações tumorais por infiltração de células mononucleares (linfócitos, pró-linfócitos e linfócitos atípicos), em diferentes tecidos. A doença possui quadro sintomático pleomórfico e alterações hematológicas, evidenciadas por leucocitose e linfocitose persistente, com aumento de formas linfocitárias atípicas. Desta forma o presente estudo tem como objetivo avaliar a atipia linfocitária em bovinos da raça Holandesa Preto e Branco em animais soropositivos com ou sem a presença de linfocitose persistente e animais soronegativos para LEB e correlacioná-la com a apoptose de células CD5⁺ e a proliferação linfocitária. Assim, foram selecionados 56 animais, divididos de acordo com o leucograma e o sorodiagnóstico da LEB pela imunodifusão em ágar gel e pelo ensaio imunoenzimático em: negativos (n = 25), alinfocitóticos (AL, n= 12) e com linfocitose persistente (LP, n=19). Destes, 15 animais tiveram suas amostras sanguíneas avaliadas quanto a proliferação de linfócitos e apoptose. Os resultados deste estudo mostraram que, a contagem de leucócitos totais e os valores absolutos e relativos de linfócitos atípicos foram maiores no grupo LP. Em relação aos linfócitos atípicos, os linfócitos sombra de Gümprrecht, linfócito monocitóide e linfócito com núcleo duplo, foram encontrados nos três grupos de estudo, porém mais comumente em animais infectados pelo VLEB, predominantemente no grupo manifestando linfocitose persistente. Este trabalho demonstrou uma menor proliferação de linfócitos nos animais infectados pelo VLEB manifestando LP, associado a uma menor apoptose de células CD5⁺. Na análise da correlação entre a apoptose de células CD5⁺ e a porcentagem das populações linfocitárias entre os 15 animais, observou-se que a apoptose tem uma correlação positiva com os linfócitos com núcleo duplo, o que não ocorreu nas demais populações celulares. Na correlação entre a proliferação, foi observado nos 15 animais, que quanto maior a porcentagem de linfócitos menor é a proliferação e

quanto maior a porcentagem de linfócitos monocitóides menor a proliferação, o que não ocorreu nas demais populações celulares. Portanto, a manifestação da LP em animais naturalmente infectados pelo VLEB, pode ser associada ao aumento de linfócitos atípicos do tipo sombra de Gümprrecht, linfócito monocitóide e linfócito núcleo duplo e da menor apoptose das células CD5⁺ e da menor proliferação de linfócitos.

Palavras-chave: Linfócito. Atipias linfocitárias. Leucose Enzoótica Bovina. Bovinos.

ABSTRACT

SPINOLA, T. R. **Correlation between immunological profile and atypical lymphocytes in bovine leukemia virus infected dairy cows.** [Correlação entre a atipia linfocitária e o perfil imunológico de animais infectados pelo Vírus da Leucose Enzoótica Bovina]. 2010. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Among the diseases that cause hematological changes in cattle can cite the enzootic bovine leukemia (EBL). And in some animals, to determine tumor formations by infiltration of mononuclear cells (lymphocytes, pro-lymphocytes and atypical lymphocytes) in different tissues. The disease has symptoms very pleomorphic and hematological changes, evidenced by leukocytosis, and persistent lymphocytosis, an increase of atypical lymphocyte forms. Thus this study aims to evaluate the atypical lymphocyte in Holstein Black and White in seropositive animals with or without the presence of persistent lymphocytosis and animals seronegative LEB and correlate them with apoptosis of cells CD5 + and lymphocyte proliferation. Thus, we selected 56 animals, divided according to the WBC and serodiagnosis of LEB by agar gel immunodiffusion and by enzyme immunoassay in: negative (n = 25), non-lymphocytic (AL, n = 12) and with persistent lymphocytosis (PL, n = 19). Of these, 15 animals had their blood samples evaluated for lymphocyte proliferation and apoptosis. The results of this study showed that in total leukocytes and absolute and relative values of atypical lymphocytes were higher in group LP. Regarding atypical lymphocytes, lymphocytes Gumprecht shadow, lymphocyte and monocytoid lymphocytes with dual core, were found in the three study groups, but more commonly in animals infected VLEB, predominantly in the group with persistent lymphocytosis. This study demonstrated a reduced proliferation of lymphocytes in animals infected VLEB expressing LP, associated with lower apoptosis of CD5 + cells. In analyzing the correlation between apoptosis of cells and the percentage of CD5 + lymphocyte populations among the 15 animals, we observed that apoptosis has a positive correlation with lymphocytes with dual core, which did not occur in other cell populations. Correlation between proliferation, was observed in 15 animals, the higher the percentage of lymphocyte proliferation and lower the higher the percentage of monocytoid lymphocytes less proliferation, which did not occur in other cell populations. Therefore, the expression of LP in animals naturally infected VLEB may be associated with increased atypical lymphocytes of the type of shadow

Gumprecht, lymphocyte and lymphocyte monocytoid dual-core and reduced apoptosis of CD5 + cells and reduced lymphocyte proliferation.

Key words: Lymphocyte. Atypical lymphocyte. Enzootic Bovine Leukosis. Cattle.

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Valores do leucograma de bovinos sadios, em número absoluto e contagem diferencial relativa, utilizados como referência no presente estudo – São Paulo – 2010.....	41
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores médios e desvio padrão da contagem de leucócitos sanguíneos totais de 56 vacas holandesas preta e branca nos diferentes grupos – São Paulo – 2010.....	45
Tabela 2 -	Tabela 2: Valores da média e desvio padrão da contagem relativa de leucócitos das 56 vacas holandesas preta e branca utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010.....	46
Tabela 3 -	Tabela 3: Valores da contagem absoluta de leucócitos das 56 vacas holandesas pretas e brancas, utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010.....	48
Tabela 4 -	Correlações entre a porcentagem de linfócitos CD5 ⁺ do sangue periférico e a apoptose (CD5 ⁺ /annexin V-FITC ⁺) e as porcentagens das populações linfocitárias das 15 vacas holandesa preta e branca, utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010.....	54
Tabela 5 -	Correlações entre a porcentagem de linfócitos CD5 ⁺ do sangue periférico sofrendo apoptose (CD5 ⁺ /annexin V-FITC ⁺) e as porcentagens das populações linfocitárias das 10 vacas holandesa preta e branca, infectadas pelo vírus da leucose enzoótica bovina, utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010.....	55
Tabela 6 -	Correlações entre a porcentagem de linfócitos CD5 ⁺ do sangue periférico sofrendo apoptose (CD5 ⁺ /annexin V-FITC ⁺) e a contagem total linfócitos das 15 vacas holandesa preta e branca, utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010.....	56
Tabela 7 -	As correlações entre a porcentagem de linfócitos CD5 ⁺ do sangue periférico sofrendo apoptose (CD5 ⁺ /annexin V-FITC ⁺) e a contagem total linfócitos das 10 vacas holandesa preta e branca, infectadas pela leucose enzoótica bovina utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010.....	57
Tabela 8 -	Correlações entre o índice de proliferação celular e as porcentagens das populações linfocitárias das 15 vacas holandesa preta e branca, utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010.....	58
Tabela 9 -	Correlações entre o índice de proliferação celular e a contagem total das populações linfocitárias dos 15 animais considerados positivos para o vírus da Leucose Enzoótica bovina utilizados no presente estudo – São Paulo – 2010.....	59

Tabela 10 - Correlações entre o índice de proliferação celular e as porcentagens das populações linfocitárias dos 10 animais considerados positivos para o vírus da Leucose Enzoótica bovina utilizados no presente estudo – São Paulo – 2010..... 60

Tabela 11 - Correlações entre a proliferação de cada população celular com o índice de divisão celular da proliferação de linfócitos nos 10 animais infectados pelo VLEB – São Paulo – 2010..... 61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Maturação dos linfócitos.....	25
Figura 2 -	O histograma à esquerda ilustra a proliferação de um animal com alta resposta mitogênica, ou seja, índice de divisão celular igual a 0,98 e 68 % dos linfócitos responsivos, e à direita outro animal com baixa resposta mitogênica, com índice de proliferação igual a 0,04 e apenas 2,68 % das células responsivas, onde pode se observar um deslocamento para a esquerda dado pelo decaimento do fluorocromo CFSE (FL1+) São Paulo - 2010.....	38
Figura 3 -	Resultado do sorodiagnóstico para diagnóstico da leucose enzoótica bovina em 56 vacas holandesas preta e branca - São Paulo - 2010.....	44
Figura 4 -	Valores médios e desvio padrão da contagem total de leucócitos das 56 vacas holandesas preta e branca - São Paulo - 2010.....	45
Figura 5 -	Valores da contagem relativa de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos das 56 vacas holandesas preta e branca, nos grupos negativos, AL E LP - São Paulo - 2010.....	47
Figura 6 -	Valores da contagem relativa (%) de linfócitos atípicos, sombra de Gümprecht, linfócito monocitóide e núcleo duplo das 56 vacas holandesas preta e branca, nos grupos negativos, AL E LP - São Paulo - 2010.....	47
Figura 7 -	Valores absolutos da contagem de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos das 56 vacas holandesas preta e branca, nos grupos negativo, AL e LP - São Paulo- 2010.....	49
Figura 8 -	Valores absolutos da contagem de linfócitos atípicos, sombra de Gümprecht, linfócito monocitóide e núcleo duplo das 56 vacas holandesas preta e branca, nos grupos negativos, AL e LP - São Paulo - 2010.....	49
Figura 9 -	Fotomicrografia do linfócito de bovino. Coloração de Rosenfeld. Microscopia ótica de Imersão, aumento de 100x.....	51
Figura 10 -	Fotomicrografia do linfócito atípico do tipo sombra de Gümprescht. Coloração de Rosenfeld. Microscopia ótica de Imersão, aumento de 100x.....	51
Figura 11 -	Fotomicrografia do linfócito atípico do tipo monocitóide. Coloração de Rosenfeld. Microscopia ótica de Imersão aumento de 100x.....	52
Figura 12 -	Fotomicrografia do linfócito atípico do tipo núcleo duplo. Coloração de	

Rosenfeld. Microscopia ótica de Imersão aumento de 100x.....	52
--	----

Figura 13 - Valores médios da porcentagem de células CD5 ⁺ do sangue periférico sofrendo apoptose (Anexina V-FITC ⁺) das 15 vacas holandesas preta e branca positivas para LEB nos diferentes grupos – São Paulo – 2010.....	53
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	alinfocíticos
CD	cluster of differentiation
CMSP	células mononucleares do sangue periférico
Cm ³	centímetros cúbicos
DNA	ácido desoxiribonucleico
EDTA	ácido etilediamino tetra- acético
ELISA	ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática
EROs	espécies reativas de oxigênio
FS	fosfatilserina
FSC	forward scatter
gp 51	glicoproteína 51
GSH	glutathione reduzida
IDGA	imunodifusão em ágar gel
LEB	leucose enzootica dos bovinos
LP	linfocitose persistente
LP	linfócito picnótico
LM	linfócito monocitóide
mg	miligramas
MHC- II ⁺	complexo principal de histocompatibilidade classe II
mL	mililitros
μm	micrometros
mm	milímetros
mm ³	milímetros cúbicos
N:C	relação núcleo: citoplasma
ND	núcleo duplo
OIE	organização mundial de saúde animal
PCR	reação em cadeia da polimerase
PE	fluorocromo ficoeritrina
PLASM	plasmocitóide
SSC	side scatter
SST	solução salina tamponada
SG	sombra de grümprescht
SigM ⁺	imunoglobulina m de superfície
VLB	vírus da leucose bovina
VLEB	vírus da leucose enzoótica bovina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	SISTEMA IMUNE.....	22
2.2	LINFÓCITOS.....	24
2.3	LINFÓCITOS BOVINOS.....	26
2.4	ATÍPIA LINFOCITÁRIA.....	28
3	OBJETIVOS.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	ANIMAIS EMPREGADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	35
4.2	COLETA DE SANGUE.....	35
4.3	CITOMETRIA DE FLUXO.....	36
4.3.1	Isolamento de células mononucleares do sangue periférico.....	36
4.3.2	Proliferação de linfócitos.....	37
4.3.3	Apoptose.....	39
4.3.4	Identificação de células CD5⁺.....	39
4.4	ANÁLISE HEMATOLÓGICA.....	40
4.4.1	Leucograma.....	40
4.5	SORODIAGNÓSTICO.....	41
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5	RESULTADOS.....	43
5.1	ANÁLISE HEMATOLÓGICA.....	44
5.1.1	Leucócitos.....	44
5.1.2	Contagem diferencial de leucócitos.....	46

5.2	Apoptose de células CD5 ⁺	53
5.3	Correlações entre a apoptose de células CD5 ⁺ e as porcentagens das populações linfocitárias avaliadas no presente estudo.....	54
5.4	Correlação da contagem total de linfócitos e a porcentagem de células CD5 sofrendo apoptose.....	56
5.5	Correlação entre a contagem total de células e a porcentagem de apoptose dos animais infectados.....	57
5.6	Proliferação de Linfócitos.....	58
5.7	Correlações entre o índice de proliferação linfocitária e as porcentagens das populações linfocitárias avaliadas no presente estudo.....	58
6	DISCUSSÃO.....	62
7	CONCLUSÕES.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

No início do século passado a leucose enzoótica bovina (LEB) foi muito estudada devido a sua alta incidência nas regiões do leste da Europa e inúmeros pesquisadores descreveram métodos que favoreceram o diagnóstico precoce da enfermidade a fim de promover sua erradicação nos rebanhos leiteiros da região (BIRGEL JUNIOR, 1991). Isso realmente aconteceu, algumas regiões tornaram-se livres da doença empregando avaliações hematológicas e técnicas diversas, predominantemente de sorodiagnóstico, surgiram posteriormente facilitando o diagnóstico. O primeiro caso clínico de LEB foi relatado por Leisering, em 1861. No Brasil, a LEB foi descrita pela primeira vez em 1943, por Rangel e Machado, em exames anatomo-patológicos e a partir de 1959, muitas pesquisas foram realizadas sobre o assunto. Relato publicado por Merk et al. (1959), no Rio Grande do Sul, parece, assinalar, oficialmente, o primeiro diagnóstico clínico da doença em rebanhos Brasileiros.

Toit¹ (1916 apud BIRGEL JUNIOR, 1991, p. 22) e Knut e Volkmann² (1916 apud BIRGEL JUNIOR, 1991, p. 22) foram os pioneiros a estudar a hematologia da LEB descrevendo quadros diferenciais dos leucócitos sangüíneos de bovinos sadios e de animais acometidos pelo vírus da LEB. Esses estudos permitiram observar linfócitos atípicos no leucograma que foram denominados de linfoidócitos e caracterizados pelo aspecto imaturo dos núcleos, o que permitiu o diagnóstico da doença através do estudo da morfologia dessas células, sendo, então, um novo meio diagnóstico. A partir desses estudos foram estabelecidas normas de diagnóstico que seriam respeitadas e discutidas até hoje.

O diagnóstico hematológico da LEB passou, então, a se basear em três alterações: leucocitose, linfocitose e aparecimento de linfoidócitos (BIRGEL JUNIOR, 1991). Este embasamento não apresentou consenso, sendo confirmada por uns (PIENING, 1934; SCHOTTLER e SCHOTTLER, 1934 e THORMAHLEN, 1935), e

¹ TOIT, P.J. Beitrag zur Morphologie des normalen und leukämischen Rinderblutes. Inaugural Dissertation. Berlin, 1916.

² KNUTH, P. & VOLKMANN, O. Untersuchungen über die Lymphozytomatose des Rindes. *Zeitschrift für Infektionskrankheiten, Parasitäre- Krankheiten und Hygiene der Haustiere*, 17: 393-467, 1916.

contestada posteriormente por outro autor (PEITZMEIER, 1940), que alegava que a leucocitose com mais de 70% de linfócitos poderia aparecer no sangue durante a evolução de outras enfermidades e em muitos casos clínicos não eram detectados os linfócitos atípicos (BIRGEL JUNIOR, 1991). Em uma contestação posterior, Niepage (1953), na Alemanha Oriental, em um estudo sobre a incidência da LEB relatou que a avaliação morfológica das células era o melhor meio para se estabelecer o diagnóstico desta enfermidade, uma vez que as células atípicas predominavam nas formas tumorais da leucose, caracterizando uma reação leucemóide e demonstrando que a quantificação dos linfócitos não poderia ser uma chave importante para caracterização e diagnóstico.

Ainda na Alemanha, Rosenberger, representando a Escola Superior de Veterinária de Hannover, estabeleceu a primeira chave da leucose para o diagnóstico, chamada chave leucométrica de Götze, onde se aplicava os seguintes conceitos: (i) as alterações tumorais são multissintomáticas, mas permitem o diagnóstico clínico; (ii) as variações quantitativas e qualitativas permitem o diagnóstico hematológico; (iii) o leucograma sofre influência de fatores etário; (iiii) a LEB produz uma leucocitose intensa, aparecendo na corrente circulatória linfócitos atípicos e inúmeras células imaturas, semelhantes aos linfoidócitos (BIRGEL, 1991).

Após o estabelecimento da chave leucométrica de Götze, muitos pesquisadores estabeleceram outras chaves leucométricas como: Bendixen (1959, 1960), na Dinamarca, Tolle (1965), apresentou a chave leucométrica de Gottingen, Mammerickx (1978) a partir disso tornou-se na Alemanha, (tornando obrigatório seu uso nos países integrantes do Mercado Comum Europeu) e Dachuan et al. (1988) estabeleceram a chave leucométrica para diagnóstico na região de Wuhan, na China (BIRGEL JUNIOR, 1991).

Após o estabelecimento das chaves leucométricas muitos autores dedicaram-se aos estudos comparativos de seus resultados e de sua aplicabilidade no controle da doença. No Brasil, Alencar Filho et al. (1981) reconheceram a não aplicabilidade das chaves Leucométricas de Götze, Bendixen e Tolle para o diagnóstico da LEB, contudo no início da década de 50, alguns autores contestaram seu uso no controle da referida doença (BIRGEL JUNIOR, 1991).

No Brasil, Merkt et al. (1959), co- autor na elaboração da chave leucométrica de Götze, foi pioneiro em aplicá-la em um rebanho do Rio Grande do Sul, observando 75,5% dos animais negativos, 15,7% dos animais suspeitos e 8,6% leucóticos.

As atipias linfocíticas de Toit (1916), atraíram a atenção de inúmeros autores que ressaltaram sua importância em bovinos acometidos pela forma neoplásica da doença e, a seguir foram identificadas em animais sadios ou portadores de outras enfermidades. Os linfoidócitos foram descritos no sangue de bovinos acometidos por linfossarcoma, considerados por Thormahlen (1935), como célula primitiva causadora de leucemia e por outros pesquisadores como linfoblastos, ou prólinfócitos. As células de Rieder foram descritas por Toit (1916) em animais com linfocitomatose; contudo esta forma atípica de linfócito pode ocorrer em animais sadios. Posteriormente alguns pesquisadores denominaram as células de Rieder de linfócitos monocitóides (STOBER, 1967; BIRGEL, 1982 a; GARCIA, 1989). Inúmeros autores descreveram as células mononucleares com núcleo duplo, isolados ou apresentando ponte de cromatina, unindo o núcleo subdividido, em animais com leucose e animais sadios (NIEPAGE, 1953; ZIEGENHAGEN; DOHMEN, 1955; DEPELCHIN, 1957; WEBER, 1963; BIRGEL, 1982 a; SINGH; BANSAL, 1985; GARCIA, 1989). No sangue de bovinos sadios, leucóticos ou acometidos por outras enfermidades, foram relatadas com menor frequência presença de outras formas de atipias dos linfócitos: células linfocitóides e células fusiformes

Como visto, não há consenso sobre a especificidade da avaliação da atipia linfocitária no diagnóstico da leucose enzoótica bovina, principalmente relações entre a origem das atipias. Além dos estudos citados serem muito antigos e talvez não representem mais o padrão hematológico de animais atualmente expostos a maior diversidade antigênica, sistemas de criação mais intensivos e provável evolução do padrão viral da doença.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (VLEB), pertencente à família *Retroviridae*, um deltaretrovírus tipo C, é o agente etiológico da enfermidade linfoproliferativa conhecida como Leucose Enzoótica Bovina (LEB) (MILLER et al., 1969; SCHWARTZ et al., 1994). Este vírus infecta principalmente os linfócitos B e expressa em sua superfície o complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II⁺), imunoglobulina M de superfície (sIgM⁺) (LEVY et al., 1987; MIRSKY et al., 1996), assim como os marcadores celulares (ou grupamentos de diferenciação – CD) CD5 e CD11b.

O VLEB infecta principalmente linfócitos B (SCHWARTZ et al., 1994), integrando-se em lugares dispersos ao seu genoma (KETTMANN et al., 1979), e está associado ao desenvolvimento de linfocitose persistente (LP) e linfossarcoma (SCHWARTZ; LEVY, 1994). Os animais infectados podem apresentar-se negativos, positivos sem a presença de LP (alinfocitóticos) e positivos apresentando LP, caracterizada pela elevação crônica no número de linfócitos circulantes e é encontrada em cerca de 30 a 70 % dos bovinos infectados (GARCIA et al., 1996). Ainda, os animais infectados podem desenvolver manifestações tumorais (linfossarcomas), caracterizadas por infiltração mononuclear em órgãos ricos em tecido retículo-histiocitário (BURNY et al., 1985).

2.1 SISTEMA IMUNE

A imunologia tem passado por diversas transformações, desde seus primeiros estudos, paralelamente aos avanços da tecnologia aplicada à saúde humana e animal (JULIANO, 2006). A resposta imune é elaborada a partir de tecidos, células e mediadores químicos especializados, os quais formam o sistema imune. A

funcionalidade deste sistema depende da capacidade do mesmo em reconhecer antígenos endógenos e exógenos, esse reconhecimento ativa o sistema imune para neutralização ou diluição de antígenos (STEVENS; LOWE, 2001).

A resposta imune envolve primeiramente o reconhecimento do patógeno e posteriormente uma reação dirigida a este patógeno, com a finalidade de eliminá-lo. Possuem dois tipos de resposta imune: resposta imune inata e resposta imune adquirida (ROITT et al., 2003; BALESTIERE, 2003; JANEWAY et al., 2007).

A resposta inata é a primeira linha de defesa contra os microrganismos, realizada principalmente por macrófagos e neutrófilos, consistindo em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes da infecção se estabelecer, programadas a responder rapidamente à infecções (ABBAS et al., 2006).

Existem outras respostas imunológicas que são estimuladas pela exposição a agentes infecciosos cuja capacidade defensiva aumenta com exposições posteriores a um microrganismo em particular, chamada de imunidade natural adaptativa ou adquirida, a qual apresenta especificidade na identificação de antígenos e tem característica de memória imunológica, sendo que os linfócitos constituem as principais células desta resposta imune (ROITT et al., 2003; BALESTIERE, 2003; JANEWAY et al., 2007).

Todas as células do sistema imune possuem proteínas citoplasmáticas ou de membrana celular, que são denominadas de acordo com um sistema internacional de identificação que as relaciona com proteínas que se expressam em diferentes fase da maturação celular. Essas proteínas são chamadas de CD (*Cluster of differentiation*). Segundo Naoum (2001), já foram reconhecidos em laboratório mais de 170 diferentes tipos de CD. Entretanto, principalmente em relação aos linfócitos e macrófagos, é possível antever a importância da determinação dos CDs para a diferenciação e especificação das subpopulações das principais células do sistema imunológico.

2.2 LINFÓCITOS

Os linfócitos são células do sistema imune que conferem especificidade à resposta imunológica por serem portadoras de receptores específicos para os determinantes, sendo, portanto, as células responsáveis pelo reconhecimento dos antígenos estranhos e pela montagem das respostas imunes (TIZARD, 2002).

Os linfócitos são, em sua maioria, células pequenas de formato arredondado, variando de sete a 15 μm de diâmetro com uma borda fina de citoplasma, onde se encontram poucas organelas citoplasmáticas. No núcleo excêntrico, localiza-se a cromatina em estado condensado, que se cora intensamente e uniformemente com hematoxilina (TIZARD, 2002). Esse aspecto é típico de células inativas, visto que não exibem atividade funcional até encontrar um antígeno, assim como moléculas co-estimuladoras induzidas pela imunidade inata, as quais fornecem os sinais necessários para ativação de sua proliferação e diferenciação de características funcionais especializadas (JANEWAY et al., 2007).

Os linfócitos são oriundos da medula óssea, das células multipotentes onde no processo de segregação e distinção celular tornam-se células precursoras linfóides, dando origem às subpopulações de linfócitos que são encontradas no sangue periférico como resultado de sua produção, liberação e recirculação em diferentes estágios de maturação e imunocompetência, podendo ser classificados em primários ou secundários. Nos órgãos primários, como a medula óssea e o timo os linfócitos passam por processos de maturação e diferenciação. Após essas fases, os linfócitos migram para o baço, onde poderão exercer suas funções. Nos mamíferos, os precursores dos linfócitos que ficam na medula óssea se diferenciam em linfócitos B, enquanto os que migram da medula óssea para o timo se diferenciam em linfócitos T (BALESTIERI, 2006; WIKSTRÖM, 2006; JANEWAY et al., 2007). No sangue periférico, proporcionalmente, há 70% de células T e 20% de células B, e os 10% restante provavelmente se constitui de células não diferenciadas, contudo consideráveis variações têm sido reportadas entre as espécies. Além disso, esses números de linfócitos T no sangue periférico e nos tecidos linfóides variam com a idade e com a saúde individual. Vacas leucêmicas e

vacas com linfocitose persistente exibem aumento de células B, que compreendem mais de 97% dos linfócitos (BIRGEL, 1991).

Figura 1- Maturação dos linfócitos. Fonte: Abbas, 2006

A maturação dessas células está correlacionada a várias mudanças estruturais da mesma, como tamanho, intensidade basofílica do citoplasma, diminuição do volume nuclear, conteúdo do ADN (ácido desoxirribonucléico), condensação da cromatina, proporção de núcleo- citoplasma e capacidade de corar as histonas (FELDMAN, 2006).

Funcionalmente são agrupados de acordo com seu envolvimento na resposta imune sendo conhecidos como células imunomediadas com funções imunorregulatórias os quais podem ser timo dependente, timo derivado, timo processado, ou células T (FELDMAN, 2006).

Os linfócitos possuem receptores para antígenos específicos que reconhecem e respondem às moléculas apresentadas e, eventualmente, são responsáveis pela produção de anticorpos e destruição de células anômalas. Normalmente, essas respostas ocorrem no interior dos órgãos linfóides, o que proporciona um ambiente adequado para uma eficiente interação entre linfócitos, células apresentadoras de antígenos e antígenos (TIZARD, 2002).

Os linfócitos B quando estimulados por um antígeno, se dividem e se diferenciam em plasmócitos, secretando altas concentrações de anticorpos. A ligação dos anticorpos aos patógenos faz com que o mesmo seja neutralizado e, em seguida, lisado por enzimas do sistema complemento ou por fagócitos (FURTADO,

2006; JANEWAY et al., 2007). Os linfócitos B, plasmócitos e os anticorpos são a base da resposta imune humoral. Algumas células B se transformam em célula de memória, que permanece na circulação garantindo resposta rápida e eficaz contra futuras exposições àquele antígeno (STEVENSON, LOWE, 2001; TIZARD, 2002; JANEWAY et al., 2007).

Os linfócitos T se classificam em dois tipos: linfócitos T auxiliares (*T-helper*) e T citotóxicos. Ambos participam da resposta imune com funções reguladoras e com atividades efectoras ou citotóxicas, respectivamente (SUETAKE et al., 2006; WIKSTRÖM, 2006).

A homeostase de linfócitos é resultado do balanço crítico entre a proliferação e a morte celular. A ruptura deste equilíbrio pode levar a manifestação da LP (DEBACQ et al., 2002). Assim, a modulação do processo apoptótico associado ou não ao aumento da proliferação celular pode refletir no aumento dos linfócitos B circulantes (CD21⁺), que geralmente co-expressam a molécula CD5 e a integrina CD11b, nos animais infectados pelo VLEB manifestando LP (DEBACQ et al., 2003). Tal modulação pode ser responsável pela persistência da infecção e/ou pela progressão da enfermidade, enquanto células infectadas que apresentam antígenos virais são reconhecidas e eliminadas pelo hospedeiro (GILLET et al., 2007; CLARKE; TYLER, 2009).

A apoptose é uma forma de morte celular, na qual as células iniciam um programa de “suicídio” e alterações morfológicas características são observadas nas células moribundas e mortas. Essas alterações incluem condensação da cromatina, ruptura nucleolar, contração citoplasmática e vesiculação da membrana (ABBAS, 2006)

2.3 LINFÓCITOS BOVINOS

A quantidade de linfócitos circulantes normais para bovinos é divergente na literatura. Talvez essa divergência seja causada pela diferença entre técnicas empregadas e às variações fisiológicas e ambientais, tais como, estresse, higidez, horário da coleta, temperatura ambiente, altitude, qualidade nutricional, idade média e, possivelmente, raça e sexo (JAIN, 1986; KRAMER, 2000).

Novilhas apresentam maiores valores absolutos de linfócitos no sangue periférico que os animais adultos, apresentando um decréscimo gradual com o avanço da idade (JAIN, 1993; WYATT et al., 1994; KULBERG et al., 2004; KAMPEN et al., 2006).

Nos leucogramas de Bovinos adultos, a população de células que predominam são os linfócitos (JAIN, 1986). Jain (1986) e Kramer (2000) classificam os linfócitos bovinos, avaliados em hemogramas, em:

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

Jain (1986) observou o aparecimento de grânulos azurofílicos, de tamanho, número e formas variáveis, no citoplasma de alguns linfócitos grandes. Segundo Wellman (2000); Kramer (2000) e Harvey (2001) estas células são denominadas de linfócitos grandes granulares, sendo que a presença deste grânulo identifica os linfócitos grandes em bovinos. Segundo Jain (1986) e Kremer (2000), linfócitos maiores são denominados de células de transição, posto que podem ser confundidos com monócitos.

Segundo Harvey (2001), linfócitos reativos, caracteristicamente os linfócitos grandes agranulares de Kramer (2000), são linfócitos proliferando em resposta à estímulos antigênicos.

2.4 ATIPIA LINFOCITÁRIA

As células atípicas foram descritas em 1898, por Türk, em pacientes com infecções bacterianas. Posteriormente, vários autores também descreveram essas células em condições variáveis, sendo que o termo células mononucleares atípicas foi introduzido para descrever essas atipias, devido à natureza incerta das mesmas. Assim, observou-se que linfócitos atípicos também estavam presentes em infecções virais e infecções por protozoários (BLOOD, 2008).

No caso de infecções virais os linfócitos atípicos são definidos como formas intermediárias da ativação de linfócitos em decorrência de estímulos antigênicos virais. Tais linfócitos apresentam variações nos detalhes morfológicos e nas características dos marcadores de superfície, mostrando constituir uma mistura heterogênea de tipos celulares (SIMON, 2003).

Em algumas situações as atipias são facilmente identificadas como sendo de células intermediárias entre o linfócito e o plasmócito, oportunidade na qual pode ser denominado linfócito plasmocitóide ou plasmócito linfocitóide. Em outras, a morfologia é variável caso a caso: o tamanho é aumentado, a forma pode mostrar periferia angulosa com aspecto recortado ou poliédrico, citoplasma abundante variando desde azul escuro até cinza pálido, com condensação da basofilia na periferia da célula e eventual microvacuolização; o núcleo de forma variada pode ter localização excêntrica, eventual imagem de nucléolo, lobulação, e cromatina fina e delicada. Estudos anteriores indicavam serem estas células tanto do tipo B quanto T. Os estudos mais recentes sugerem que estes linfócitos atípicos são linfócitos T ativados produzidos em resposta a linfócitos B (SIMON, 2003).

Dentre as enfermidades que causam alterações hematológicas em bovinos podemos citar a leucose enzootica bovina, caracterizando-se por proliferação linfocitária, determinando formações tumorais por infiltração de células mononucleares (linfócitos, pró-linfócitos e linfócitos atípicos), com quadro sintomático pleomórfico e alterações hematológicas, evidenciadas por leucocitose e linfocitose persistente, com aumento de formas linfocitárias atípicas (BIRGEL et al, 1982).

A maioria das células envolvidas na LP são linfócitos normais. Contudo, formas atípicas e anormais foram descritas tempos atrás e eram consideradas como indicativo de condição pré-leucêmica (DU TOIT et al., 1916; GOTZE et al. 1954; URBANECK et al., 1969), porém, formas celulares idênticas foram observadas em animais considerados normais, sem considerar a execução de testes mais sensíveis como o ELISA (Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática) e a PCR (Reação em cadeia de Polimerase) na identificação da LEB, e mais freqüentemente em animais afetados com várias formas da doença não tumoral (WEBER, 1963; MARSHAK; ABT, 1968 apud PARODI, 1987, p.30).

Em relação aos aspectos morfológicos dos linfócitos, Garcia et al. (1990) notaram que: sombras de Gümprrecht, linfócitos com núcleos marcados, linfócitos com núcleo picnótico, linfócitos com granulações azurófilas e células de Türk não possuem importância decisiva no diagnóstico de Leucose Enzoótica Bovina. Todavia, devem-se ressaltar os resultados, encontrados para duas atipias que demonstraram significância no diagnóstico hematológico desta infecção, ou seja, os linfócitos monocitóides (Células de Riedel) e os linfócitos com núcleo duplo (Células Tetraplóides), concluindo que os resultados obtidos demonstraram que a avaliação hematológica adequada continua sendo um recurso no diagnóstico hematológico da Leucose Enzoótica Bovina. Segundo Birgel (1982), linfócitos atípicos são diferenciados conforme uma classificação:

- Sombras de Gümprrecht caracterizados pelo aparecimento de fragmentos nucleares esfacelados;
- Linfócitos monocitóides caracterizados por núcleos deformados e riniformes;
- Linfócitos com nucléolos de coloração mais acentuada;
- Linfócitos com núcleo duplo, que são células tetraplóides, sendo mais freqüentes nos animais infectados pela LEB, em algumas há divisão e separação completa dos dois núcleos e em outras se observa delgada ponte de cromatina ligando os dois núcleos;
- Linfócitos com núcleo picnótico, às vezes denominadas de linfocitóides de menor diâmetro com cromatina muito condensada e sem citoplasma evidente;

- Células de Türk que apresentam núcleo condensado e citoplasma granuloso abundante e de coloração azul celeste;
- Linfócitos com granulações azurófilas bizarras e grosseiras que são mais evidentes nos linfócitos grandes concentradas em certas porções do citoplasma.

Segundo Cockerell e Reyes (2000), linfócitos atípicos podem ser encontrados em leucogramas de animais apresentando LP, contudo, essas células também podem ser observadas em animais sadios ou portadores da LEB.

Devido á alta incidência da LEB (TOIT, 1916; KNUTH, VOLKMANN, 1916) diversos pesquisadores, da região leste da Europa, estudaram e avaliaram normas que auxiliariam seu diagnóstico precoce a fim de evitar sua disseminação nos rebanhos leiteiros.

O diagnóstico da LEB foi primeiramente estabelecido através de alterações hematológicas, baseado no número absoluto de leucócitos e relativo de linfócitos, visto que era considerado que a leucocitose com linfocitose e presença de linfócitos atípicos permitiria o diagnóstico precoce da enfermidade, levando-se em consideração a influência de fatores regionais, da idade e das condições gerais de saúde (WITTMANN; SEILS, 1969; GARCIA et al., 1990; MELDRUM, 1993).

Knuth e Volkmann (1916), ao estudarem as alterações hematológicas causadas pela doença, constataram que tanto os animais portadores de linfossarcomas, quanto os aparentemente sadios apresentavam alteração no sangue com leucocitose e acentuada linfocitose, além do aparecimento de linfócitos atípicos no sangue periférico do animal. Tal fato permitiu diagnóstico prévio da doença baseado em chaves leucométricas e em estudo de atipias linfocitárias.

Desta forma na Europa foram estabelecidas chaves leucométricas, que facilitaram o diagnóstico da doença pelos clínicos, e assim possibilitaram o controle da doença em países como a Alemanha e Dinamarca (GÖTZE et al., 1954; BENDIXEN, 1961; TOLLE, 1965).

A primeira chave Leucométrica para diagnóstico da LEB foi estudada por Götze et al., 1954; e apresentava dois padrões de comparação, fundamentados no

número total de leucócitos e número relativos de linfócitos e três possibilidades de interpretação, permitindo detectar-se animais normais, suspeitos e positivos para leucose bovina.

Winqvist (1958) realizou uma transformação na chave leucométrica, substituindo o conceito duplo de avaliação pelo número total de leucócitos e número relativo de linfócitos por um único, baseado no número absoluto de linfócitos por unidade de sangue, não se dando importância a idade dos animais, considerando-se normal os valores até 6.000 linfócitos/mm³; como suspeitos os resultados entre 6.000 e 12.000 linfócitos /mm³ e como positivos os valores com mais de 12.000 linfócitos/ mm³. Nestes casos, recomenda-se associar a avaliação morfológica dos linfócitos, ressaltando valor diagnóstico para as células imaturas e recomendando exame de sangue, em microscopia de contraste de fase.

Bendixen, em 1959 e 1960, na Dinamarca, apresenta chave leucométrica para diagnóstico da LEB, estratificando os índices em cinco grupos etários e caracterizando os resultados em normais, duvidosos e com linfocitose. Neste caso as modificações qualitativas dos linfócitos deveriam ser consideradas e se as células patológicas fossem detectadas em número significativo, o animal seria classificado no grupo dos animais com linfocitose, mesmo que se não fosse observado modificações quantitativas.

Já Tolle em 1965, estabeleceu a chave leucométrica de Gottingen para o diagnóstico da LEB, mantendo os mesmos princípios: linfocitose absoluta e variação do número absoluto de linfócitos em cinco faixas etárias e manteve três possibilidades de interpretação hematológica individual dos resultados: normal, moderada e intensamente aumentada.

Após muitos estudos sobre as chaves leucométricas para o diagnóstico da LEB, muitos autores dedicaram-se ao estudo comparativo de seus resultados e de sua aplicabilidade no controle da doença.

Porém as mesmas não foram aplicadas em animais criados em condições climáticas subtropicais, como o Brasil, uma vez que, o quadro leucocitário sofre influências raciais, alimentares e de forma de manejo realizado freqüentemente no nosso país (BIRGEL et al., 1974).

Segundo Birgel (1982), as chaves leucométricas perdem valor de diagnóstico, pois detectam apenas 61,5% dos casos positivos. Este problema foi questionado por outros autores, pois muitas vezes não foram encontradas diferenças significativas entre o número de linfócitos de animais sororeagentes e não sororeagentes (SCARCI, 1980; RIBEIRO, 1987).

Os primeiros trabalhos sobre hematologia da LEB foram estudados por Toit (1916) e Knut & Volkmann (1916), onde descreveram o quadro diferencial dos leucócitos do sangue de bovinos sadios e de animais pertencentes a rebanhos, onde ocorria com freqüência a forma clínica de Leucose, destacando o aparecimento no sangue circulante de linfócitos atípicos, denominados de linfoidócitos e caracterizado pelo aspecto imaturo dos núcleos, permitindo o diagnóstico da doença.

Segundo Knut & Volkmann (1916), o diagnóstico da LEB deveria basear-se em três modificações hematológicas: leucocitose, linfocitose e aparecimento de linfoidócitos. Outros autores (PIENING, 1934; SCHOTTLER & SCHOTTLER, 1934; THORMAHLEN, 1935), também confirmaram o que Toit (1916) e Knut & Volkmann (1916) relataram. Já em 1940, Peitzmeier contestou o diagnóstico precoce da enfermidade através do leucograma, pois também encontrou linfócitos imaturos ou células atípicas em animais sadios. Segundo Niepage, (1953), o melhor para se diagnosticar a LEB era a avaliação morfológica das células e não a quantificação dos linfócitos.

Os achados hematológicos do linfoma bovino é compreendido como figuras mitóticas, linfoblastos e células mononucleares com múltiplos lobos nucleares assimétricos, são frequentemente observados em Leucemia com forma de linfomas. Em aproximadamente 55% dos casos de linfoma o hemograma revela leve à moderada leucocitose com aumento absoluto de linfócitos. Achados negativos no sangue, não necessariamente excluem a possibilidade de linfoma, contudo alguns linfócitos anormais podem algumas vezes ser encontrado em animais normais e animais com LP (SHALM, 1986).

Atualmente a LEB pode ser diagnosticada por métodos sorológicos e de isolamento, como imunodifusão em agar gel (IDGA) (BIRGEL, 1982) e ELISA (DE GIUSEPPE et al., 2004; GONZÁLEZ et al., 1999; MOLLOY et al., 1990), para o

sorodiagnóstico, ou reação em cadeia de polimerase (PCR), para detecção direta do genoma viral (NAIF et al., 1990; REICHERT; STEC, 1999).

As técnicas para pesquisa de anticorpos recomendadas pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) são a IDGA e o ELISA, que detectam anticorpos contra a glicoproteína do envelope viral de peso molecular 51 quilodaltons, denominada gp51 (OIE, 2003b).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar atipia linfocitária em bovinos da raça Holandesa Preto e Branco naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina.

3.2 Objetivos Específicos:

- Relacionar as atipias aos índices de apoptose e proliferação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EMPREGADOS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram coletadas amostras sangüíneas de 200 fêmeas adultas oriundas de rebanhos destinados à produção de leite, localizados no Estado de São Paulo. Dentre estes animais, foram selecionados 56 animais sem alterações clínicas evidentes, subdivididos uniformemente conforme o resultado do sorodiagnóstico e do leucograma em três grupos. Além disso, com objetivo de manter a homogeneidade amostral, buscou-se a inclusão de animais na mesma fase da lactação e lote de alimentação, divididos uniformemente nos seus devidos grupos. Um grupo foi composto por animais com sorodiagnóstico negativo, outro grupo continha animais com sorodiagnóstico positivo e alinfocitóticos, portanto, ambos sem alterações hematológicas conforme critérios estabelecidos para a espécie, e o terceiro grupo formado por animais com sorodiagnóstico positivo apresentando linfocitose persistente. Foram considerados animais apresentando linfocitose aqueles com contagem total de linfócitos superior a $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ e contagem total de leucócitos superior a $15 \times 10^3/\mu\text{L}$ conforme critérios estabelecidos por Brenner et al. (2007), e a persistência desta foi confirmada num intervalo de 72 dias, quando então puderam ser analisados.

Destes animais, 25 foram considerados negativos, 12 AL, estes sem alteração na contagem total de leucócitos conforme critérios estabelecidos por Divers e Peek (2008), e 19 LP.

Dentro destes 56 animais, em 15 animais foram realizadas as quantificações de linfócitos B por citometria de fluxo, isolamento de células mononucleares do sangue periférico, proliferação de linfócitos e apoptose.

4.2 COLETA DE SANGUE

Foram coletadas de cada animal, por venopunção jugular, utilizando-se sistema

a vácuo, três amostras de sangue. Uma amostra em tubo siliconizado sem anticoagulante, com capacidade de 10 mL, e agulha para múltiplas colheitas (25 mm X 8 mm) do sistema Vacutainer[®] (Becton Dickinson[™]), que foram identificadas e transportadas sob refrigeração até o laboratório. O soro assim obtido foi conservado à temperatura de -20°C até a realização do sorodiagnóstico para LEB. A outra amostra foi coletada, utilizando sistema a vácuo, amostra em tubo siliconizado com EDTA tripotássico na proporção de 1,5 mg/mL de sangue (capacidade para 5 mL), que também foi identificada e transportada até o laboratório. Tais amostras foram utilizadas para a realização de hemograma, esfregaços sanguíneos e identificação das atipias linfocitárias.

4.3 CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é utilizada para avaliação quantitativa e qualitativa de células em suspensão. A transmissão ou a refração da luz pelas células são captadas por meio de detectores: *Side Scatter* (SSC) – sensível à dispersão lateral da luz, que fornece idéia de tamanho das células; *Forward Scatter* (FSC) – sensível à dispersão frontal da luz, que fornece parâmetros da granulidade celular; e os detectores de fluorescência FL1 (verde), FL2 (alaranjada), e FL3 (vermelha). A fluorescência verde é mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL1), a fluorescência laranja a 585 ± 42 nm, e a fluorescência vermelha (FL3) acima de 670 nm.

Os resultados foram analisados pelo programa FlowJo[®], versão 7.1.3. (Tree Star[™], Inc., Ashland, EUA).

4.3.1 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas por gradiente de densidade Ficoll-Paque[™] Plus[®] (GEHealthcare, EUA, n°. cat. 17-1440-03) (densidade 1, 077 g/cm³) em fluxo laminar. Foram utilizados, 10 mL de sangue periférico e foram adicionadas a 10 mL de meio de cultura celular RPMI-1640[®]

(Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n°. cat. R7638) contendo 2 mM de L-glutamina (GIBCO™ Invitrogen, Grand Island, EUA, n°. cat. 21051-024) e 5×10^{-2} mM de 2-mercaptoetanol (Invitrogen, Grand Island, EUA, n°. cat. 21985-023). Esta solução celular resultante foi colocada sobre a fase de Ficoll, e submetida à centrifugação 700g por 40 minutos a 18° C. Após a centrifugação, a camada de células mononucleares, localizada na interfase entre a camada de Ficoll e constituintes do plasma, foi coletada e transferida para tubo cônico de 15 mL, que foi completado com RPMI-1640®, e submetido à centrifugação (250g por 8 minutos). Posteriormente, procedeu-se a lise das hemácias utilizando 10 mL de solução de cloreto de amônio (0,8 % de NH₄Cl, 0,1 mM EDTA). Logo após, foi realizada nova centrifugação (250g por 8 minutos), e o botão celular resultante foi ressuspensionado em 4 mL de RPMI-1640®.

4.3.2 - Proliferação de linfócitos

A avaliação da proliferação celular se deu pela utilização do CFSE-DA (5-(6-*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) (5 mM/mL) (Invitrogen, Carlsbad, EUA, n°. cat. C1157) como descrito Lyons e Parish (1994); Lyons (2000) e Hawkins et al. (2007). Os ensaios de proliferação linfocitária também foram induzidos por concavalina-A tipo III (10 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n°. cat. C2631), por lipopolisacárides (LPS) de *Escherichia coli* (cepa O127: B8) (25 µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n°. cat. L3129), e selenito de sódio (1, 10 e 50 mM/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n°. cat. 21448-5). A suplementação de selenito de sódio se deu por ser uma fonte de selênio amplamente utilizada.

Para as avaliações da proliferação dos linfócitos, o sangue periférico inicialmente foi submetido à separação de mononucleares por gradiente de densidade Ficoll, como anteriormente descrito. As células foram, então, contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan (EMD Chemicals Inc., Gibbstown, EUA, cat. n° 368-12), permitindo a verificação de viabilidade dos linfócitos bem como o ajuste do número de células para 1×10^7 células/ mL.

Mediante a obtenção e o ajuste do número de linfócitos, adicionou-se às amostras 1 µL do fluorocromo CFSE-DA, que foi incubado por 20 minutos em estufa

a 37° C, 5% CO₂. Posteriormente, centrifugou-se as amostras e ressuspendeu-as em RPMI-1640® estéril contendo 10 % soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil), 2mM de L-glutamina, 5 x 10⁻² mM de 2-mercapoetanol. Então, realizou-se o reajuste celular para 2,2x10⁶ células/ml com o objetivo de ter 2x10⁵ células por poço de cultura (90 µl). Ajustadas as suspensões celulares, estas foram plaqueadas em triplicata, juntamente com seus respectivos estímulos (10 µl), e mantidas em cultura celular em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ por três dias, para posterior avaliação por citometria de fluxo, onde 50.000 eventos foram adquiridos.

O cálculo da proliferação deu-se pela análise da população correspondente aos linfócitos, e suas respectivas subpopulações (linfócitos B e T), no *software FlowJo*, o qual calcula a progressão geométrica de decaimento do fluorocromo CFSE das células. Considera-se que cada célula plaqueada continha 100% do CFSE fornecido, ao realizar mitose, 50% de fluorocromo resta em cada célula-filha. Estas, à divisão, fornecem 25% a cada célula-filha, das quais as filhas por sua vez passam a ter 12,5% do fluorocromo, e assim sucessivamente (LYONS; PARISH, 1994; LYONS, 2000; HAWKINS et al., 2007), como ilustrado na figura 2.

Figura 2 - O histograma à esquerda ilustra a proliferação de um animal com alta resposta mitogênica, ou seja, índice de divisão celular igual a 0,98 e 68 % dos linfócitos responsivos, e à direita outro animal com baixa resposta mitogênica, com índice de proliferação igual a 0,04 e apenas 2,68 % das células responsivas, onde pode se observar um deslocamento para a esquerda dado pelo decaimento do fluorocromo CFSE (FL1⁺) – São Paulo – 2010

4.3.3 Apoptose

A expressão da fosfatilserina (FS) na superfície celular é um dos marcadores precoces do processo apoptótico. A porcentagem de células CD5⁺ sofrendo apoptose foi realizada utilizando a anexina V-FITC (APOPTESTM-FITC, Dako Cytomation, Finlândia, cat. Number K2350) e analisados por citometria de fluxo, como descrito por Vermes et al. (1995) com algumas modificações. Para tal, 100 µL de sangue venoso heparinizado foram utilizados. Inicialmente, os eritrócitos foram lisados, e submetidos à centrifugação, e então ressuspensos em 1 µL de tampão de ligação (10 mM Hepes/ 150mM NaCl/ 1mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂). Posteriormente, submeteram-se as amostras a nova centrifugação, e ressuspendeu-as em 100 µL de tampão de ligação com anexina V-FITC, e finalmente incubou a suspensão celular por 20 minutos a temperatura ambiente sob ausência de luminosidade.

4.3.4 Identificação de células CD5⁺

A quantificação da população de linfócitos CD5⁺ do sangue total foi realizada utilizando anticorpo monoclonal primário: *mouse IgG2a anti-bovine CD5* (VRMD, Pullman, EUA, n°. cat. B29A), e anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse IgG2a* conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE) (Invitrogen, Carlsbad, EUA, n°. cat. M32204).

Para tal, as amostras após a realização do ensaio para determinação do processo apoptótico foram então submetidas à centrifugação a 250g por 8 minutos. O botão celular resultante foi ressuspensado em 100 µL de tampão de ligação, e então incubado com 1 µL do anticorpo primário por 30 minutos a temperatura ambiente sob ausência de luminosidade. Mais uma vez, foi adicionado a cada tubo 1 mL de tampão de ligação, e submetido a centrifugação a 250g por 8 minutos. Posteriormente, estas amostras foram ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação, e incubadas com 1 µL do anticorpo secundário por 30 minutos a temperatura ambiente sob ausência de luminosidade. Logo após, adicionou-se 1 mL

de tampão de ligação, e submeteu-se a centrifugação. As amostras foram ressuspendidas em 300 µL de tampão de ligação, e então analisadas por citometria de fluxo FACSCalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, EUA), onde 20.000 eventos referente a população de linfócitos CD5⁺ foram adquiridos.

4.4 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

4.4.1 Leucograma

O número total de leucócitos por microlitro foi mensurado através de contagem automática (ABC Vet® - ABX™).

A contagem diferencial foi realizada através de esfregaços sangüíneos corados pelo corante de Rosenfeld, como citado por Birgel (1982). Tal método consiste em cobrir o esfregaço com 1mL de corante durante 3 minutos, após isso junta-se com 1 mL de água destilada durante 13 minutos, lavando o esfregaço em seguida com água destilada. Após seca-se a lâmina e observou-se o esfregaço em objetiva de imersão, onde foram contados 100 leucócitos, que serão diferenciados em neutrófilos, bastonetes, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. Deu especial atenção à morfologia linfocitária classificando tais células como típicas ou atípicas.

Consideraram-se linfócitos atípicos aqueles que apresentarem algumas das seguintes alterações morfológicas (BIRGEL, 1982):

- Linfócitos monocitóides: caracterizados por núcleos deformados e riniformes;
- Sombras de Grümpprecht: caracterizados por fragmentos nucleares esfacelados;
- Linfócitos com núcleo marcado: identificados pelas condensações no núcleo com coloração mais acentuada;
- Linfócitos com núcleo duplo;
- Linfócitos com núcleo picnótico: caracterizado por células de menor tamanho com cromatina bem condensada e sem citoplasma evidente;
- Linfócito com granulações citoplasmáticas azurrofilícas bizarras e grosseiras;

- Células de Türk: identificadas pelo núcleo condensado e citoplasma granuloso e abundante com coloração azul celeste.

Foram considerados como referência para as contagens leucocitárias dos animais, os dados obtidos por Kramer (2000) e Divers e Peek (2008).

Leucócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Eosinófilos	Monócitos	Basófilos
10³/μL	1,1 – 5,7	2,3 – 9,3	0 – 2,0	0 – 0,6	0 – 0,2
%	15 – 47	45 – 75	0 – 20	2 – 7	0 – 2

Fonte: (KRAMER et al., 2000; DIVERS; PEEK, 2008).

Quadro 1 - Valores do leucograma de bovinos saudáveis, em número absoluto e contagem diferencial relativa, utilizados como referência no presente estudo – São Paulo - 2010

4.5 SORODIAGNÓSTICO

O sorodiagnóstico foi realizado por kit comercial de IDGA (Tecpar®, Curitiba, Brasil), e por kit comercial de ELISA (VRMD, Pullman, EUA, n.º. cat. 284-5) através da detecção da glicoproteína gp51 do vírus da LEB, conforme recomendações do fabricante.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição de Gaussian foi verificada pelo teste de Kolmogorov e Smirnov. Os dados que apresentaram distribuição paramétrica foram submetidos à análise de variância para verificar as diferenças entre os grupos. Caso houvesse diferença significativa, procedeu-se o teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas entre as médias. Neste caso, as médias ($\pm$ desvio-padrão) foram apresentadas. Os dados que apresentaram distribuição não paramétrica foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Neste caso, os dados foram apresentados em valores medianos. A análise estatística foi realizada utilizando o

programa GraphPad Prisma 5.0 *software* (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Foram consideradas significantes as análises que apresentaram $P < 0,05$. As correlações entre as diferentes contagens se deram pela correlação de Pearson utilizando o programa MINITAB 16 (Minitab Inc., USA).

5 RESULTADOS

Para a triagem dos animais utilizados, foram coletadas amostras sanguíneas de 200 fêmeas bovinas da raça Holandesa Preta e Branca, provenientes do Estado de São Paulo, e que atendessem aos critérios de inclusão amostral propostos no material e métodos. Destas amostras foram selecionadas 56 de acordo com os valores de referência de Divers e Pike (2008).

Das 56 amostras de sangue coletadas, 25 foram consideradas negativas no IDGA e no ELISA e 31 foram consideradas positivas tanto no IDGA quanto no ELISA. Entre essas 31 amostras, 12 foram classificadas como alinfocíticas e 19 como linfocitose persistente de acordo com o hemograma. Estes dados estão representados na Figura 3.

Figura 3 - Resultado do sorodiagnóstico para diagnóstico da leucose enzoótica bovina em 56 vacas holandesas preta e branca - São Paulo – 2010

5.1 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

5.1.1 Leucócitos

Os valores médios da contagem total de leucócitos foram de $10,364 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($\pm 1,355$)^a, $10,117 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($\pm 1,408$)^a, $27,968 \times 10^3/\mu\text{L}$ ($\pm 6,793$)^b, nos animais negativos, AL e LP ($P < 0,0001$), respectivamente, como demonstrado na Tabela 1 e Figura 4.

Tabela 1 - Valores médios e desvio padrão da contagem de leucócitos sanguíneos totais de 56 vacas holandesas preta e branca nos diferentes grupos – São Paulo – 2010

	Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)		
	Negativo	AL	LP
Média	10, 364 ($\pm$ 1355) ^a	10,117 ($\pm$ 1,408) ^a	27, 968 ($\pm$ 6, 793) ^b

Letras diferentes entre linhas indicam $P = 0,0001$. Negativos: animais não sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina. AL: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina. LP: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina manifestando linfocitose persistente.

Figura 4- Valores médios e desvio padrão da contagem total de leucócitos das 56 vacas holandesas preta e branca – São Paulo – 2010

5.1.2 Contagem diferencial de leucócitos

As contagens relativas das diferentes populações leucocitárias estão apresentadas na Tabela 2, assim como a distribuição dos dados nas figuras 5 e 6. Salienta-se que, nos animais analisados no presente estudo não encontrou as populações de linfócitos atípicos conhecidos como linfócito picnótico e linfócito plasmocitóide.

Tabela 2- Valores da média e desvio padrão da contagem relativa de leucócitos das 56 vacas holandesas preta e branca utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010

Porcentagem das Populações dos diferentes Leucócitos/Grupos	Negativos	AL	LP
Neutrófilos	30,00 (± 9,57) ^{a****}	23,58 (± 5,42) ^{a***}	13,35 (± 6,17) ^b
Eosinófilos	4,0 (0,0 – 19,0)	4,5 (1,0 – 12,0)	3,0 (0,0 – 7,0)
Monócitos	2,0 (0,0- 4,0) ^{ab}	2,5 (1,0 – 5,0) ^a	1,0 (0,0 – 4,0) ^{b*}
Basófilos	0,0 (0,0- 1,0)	0,0 (0,0- 1,0)	0,0 (0,0 – 1,0)
Linfócitos	62,56 (± 2,16) ^a	68,25 (±1,79) ^a	82,45 (±1,71) ^{b****}
LA	1,0 (0,0- 9,0) ^a	1,0 (0,0- 8,0) ^{ab}	4,0 (0,0 – 10,0) ^{b***}
SG	1,0 (0,0 -3,0) ^a	1,0 (0,0- 5,0) ^{ab}	2,0 (0,0 – 5,0) ^{b**}
LM	0,0 (0,0-3,0) ^a	0,0 (0,0- 3,0) ^{ab}	0,5 (0,0 – 6,0) ^{b*}
LP	0,0	0,0	0,0
PLASM	0,0	0,0	0,0
ND	0,0 (0,0- 7,0) ^{a***}	0,0 (0,0- 1,0) ^{a*}	1,0 (0,0- 3,0) ^b

Letras diferentes entre colunas indicam $P \leq 0,05$.
Negativos: animais não sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina
AL: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina
LP: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina manifestando linfocitose persistente
LA: porcentagem de linfócitos atípicos. SG: porcentagem de linfócitos apresentando sombras nucleares. LM: porcentagem de linfócitos monocitóides. LP: porcentagem de linfócitos picnóticos. PLASM: porcentagem de linfócitos plasmocitóides. ND: porcentagem de linfócitos com núcleo duplo.

****: $P = 0,0001$
***: $P \leq 0,001$
**: $P \leq 0,01$
*: $P < 0,05$

Figura 5- Valores da contagem relativa de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos das 56 vacas holandesas preta e branca, nos grupos negativos, AL E LP – São Paulo - 2010

Figura 6- Valores da contagem relativa (%) de linfócitos atípicos, sombra de Gümprrecht, linfócito monocitóide e núcleo duplo das 56 vacas holandesas preta e branca, nos grupos negativos, AL E LP – São Paulo -

Os valores das contagens absolutas das diferentes populações leucocitárias (linfócitos – Figura 9) e dos linfócitos atípicos: sombra de Gümprrecht (Figura: 10), linfócito monocitóide (Figura: 11), linfócito picnótico, linfócito plasmocitóide e linfócito núcleo duplo (Figura: 12) pode-se observar na Tabela 3, assim como a distribuição dos dados nas figuras 7 e 8.

Tabela 3- Valores da contagem absoluta de leucócitos das 56 vacas holandesas pretas e brancas, utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010

Leucócitos/Grupos	Negativos	AL	LP
Neutrófilos	3.115 (±1.075) ^{ab}	2.392 (±684) ^a	3.687 (±1.287) ^{b*}
Eosinófilos	348 (0,0- 1.634)	0,0 (86- 1.185)	920,7(0,0- 1.735)
Monócitos	180 (0,0- 488)	245 (0,0- 540)	325 (0,0- 1.164)
Basófilos	0,0 (0,0- 98)	0,0 (0,0- 116)	0,0 (0,0- 220)
Linfócitos	6.478 (± 1.343) ^a	6.884 (±1.010) ^a	23.119 (±6.916) ^{b****}
LA	97 (0,0- 972) ^{a****}	108,5 (0,0- 768) ^{a***}	1.312 (0,0- 2.455) ^b
SG	90 (0,0- 345) ^{a****}	107,5 (0,0- 480) ^{a*}	656 (0,0- 1.645) ^b
LM	0,0 (0,0-345) ^a	0,0 (0,0- 291) ^{ab}	0,0 (0,0- 1.320) ^{b**}
LP	0,0	0,0	0,0
PLASM	0,0	0,0	0,0
ND	0,0 (0,0-756) ^{a***}	0,0 (0,0- 116) ^{a*}	220 (0,0-920,7) ^b

Letras diferentes entre colunas indicam $P \leq 0,05$.
Negativos: animais não sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina
AL: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina
LP: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina manifestando linfocitose persistente.
LA: porcentagem de linfócitos atípicos. SG: porcentagem de linfócitos apresentando sombras nucleares. LM: porcentagem de linfócitos monocitóides. LP: porcentagem de linfócitos picnóticos. PLASM: porcentagem de linfócitos plasmocitóides. ND: porcentagem de linfócitos com núcleo duplo.
****. $P = 0,0001$
***. $P \leq 0,001$
**. $P \leq 0,01$
*. $P < 0,05$

Figura 7 - Valores absolutos da contagem de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos das 56 vacas holandesas preta e branca, nos grupos negativo, AL e LP – São Paulo- 2010

Figura 8 - Valores absolutos da contagem de linfócitos atípicos, sombra de Gümprrecht, linfócito monocitóide e núcleo duplo das 56 vacas holandesas preta e branca, nos grupos negativos, AL e LP – São Paulo – 2010

Os valores medianos da relação entre a porcentagem de linfócitos atípicos e a porcentagem de linfócitos totais nos animais negativos, AL e LP foram de 3,33^a % (0,0 – 21,18), 3,28^{ab} % (0,0 – 20,51), 10^b % (0,0 – 23,81) (P = 0, 002).

Figura 9 - Fotomicrografia do linfócito de bovino. Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de Imersão aumento de 100x

Figura 10 - Fotomicrografia do linfócito atípico do tipo sombra de Gümprescht. Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de Imersão aumento de 100X

Figura 11 - Fotomicrografia do linfócito atípico do tipo monocitóide. Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de Imersão aumento de 100 x.

Figura 12 - Fotomicrografia do linfócito atípico do tipo núcleo duplo. Coloração de Rosenfeld. Microscopia óptica de Imersão aumento de 100 X.

5.2 Apoptose de células CD5⁺

A porcentagem de linfócitos CD5⁺ do sangue periférico sofrendo apoptose (CD5⁺/annexin V-FITC⁺) foi de 0,56^a % ($\pm$ 0,34) nos animais negativos, 0,60^a % ($\pm$ 0,35) nos animais AL e 0,11^b % nos animais LP ($\pm$ 0,08) ($P < 0,031$), como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 - Valores médios da porcentagem de células CD5⁺ do sangue periférico sofrendo apoptose (Anexina V-FITC⁺) das 15 vacas holandesas preta e branca positivas para LEB nos diferentes grupos – São Paulo - 2010

5.3 Correlações entre a apoptose de células CD5⁺ e as porcentagens das populações linfocitárias avaliadas no presente estudo

A correlação entre a apoptose de células CD5⁺ (CD5⁺/annexin V-FITC⁺) e a porcentagem das populações linfocitárias entre os 15 animais, estão representadas na Tabela 4:

Tabela 4 - Correlações entre a porcentagem de linfócitos CD5⁺ do sangue periférico e a apoptose (CD5⁺/annexin V-FITC⁺) e as porcentagens das populações linfocitárias das 15 vacas holandesa preta e branca, utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010

Linfócitos Totais e Linfócitos Atípicos	Índice de correlação(r)	P
Linfócitos	0,280	P= 0,31
LA	0,412	P = 0,13
SG	- 0,078	P = 0,78
LM	- 0,124	P= 0,66
ND	0,525	P= 0,044

LA: porcentagem de linfócitos atípicos. SG: porcentagem de linfócitos apresentando sombras nucleares. LM: porcentagem de linfócitos monocitóides. LP: porcentagem de linfócitos picnóticos. PLASM: porcentagem de linfócitos plasmocitóides. ND: porcentagem de linfócitos com núcleo duplo.

r = coeficiente de correlação

P = valor de significância

As correlações nos 15 animais entre a porcentagem de apoptose das células CD5⁺ (CD5⁺/annexin V-FITC⁺) e a porcentagem de linfócitos, linfócitos atípicos, sombras de Gümprrecht, linfócito monocitóide e linfócito núcleo duplo

foram de $r = 0,280$ ($P = 0,31$), $r = 0,412$ ($P = 0,13$), $r = -0,078$ ($P = 0,78$), $r = -0,124$ ($P = 0,66$), $r = 0,525$ ($P = 0,044$), respectivamente.

Na Tabela 5, observa-se a correlação entre a apoptose das células $CD5^+$ ($CD5^+/\text{annexin V-FITC}^+$) e as porcentagens das populações linfocitárias, nos 10 animais considerados positivos para Leucose Enzoótica Bovina.

Tabela 5 - Correlações entre a porcentagem de linfócitos $CD5^+$ do sangue periférico sofrendo apoptose ($CD5^+/\text{annexin V-FITC}^+$) e as porcentagens das populações linfocitárias das 10 vacas holandesa preta e branca, infectadas pelo vírus da leucose enzoótica bovina, utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010

Linfócitos totais e linfócitos atípicos	Índice de correlação (r)	P
Linfócitos	0,585	$P = 0,076$
LA	0,444	$P = 0,20$
SG	-0,076	$P = 0,84$
LM	-0,276	$P = 0,44$
ND	0,584	$P = 0,076$

LA: porcentagem de linfócitos atípicos. SG: porcentagem de linfócitos apresentando sombras nucleares. LM: porcentagem de linfócitos monocitóides. LP: porcentagem de linfócitos picnóticos. PLASM: porcentagem de linfócitos plasmocitóides. ND: porcentagem de linfócitos com núcleo duplo.

r = coeficiente de correlação

P = valor de significância

As correlações entre a porcentagem de apoptose das células $CD5^+$ ($CD5^+/\text{annexin V-FITC}^+$) e a porcentagem das populações linfocitárias: linfócitos, linfócitos atípicos, sombras de Gümprrecht, linfócito monocitóide e linfócito núcleo duplo nos 10 animais positivos para LEB foram de $r = 0,585$ ($P = 0,076$), $r = 0,444$ ($P = 0,20$), $r = -0,076$ ($P = 0,84$), $r = -0,276$ ($P = 0,44$), $r = 0,584$ ($P = 0,076$), respectivamente.

5.4 Correlação da contagem total de linfócitos e a porcentagem de células CD5⁺ sofrendo apoptose

Tabela 6 - Correlações entre a porcentagem de linfócitos CD5⁺ do sangue periférico sofrendo apoptose (CD5⁺/annexin V-FITC⁺) e a contagem total linfócitos das 15 vacas holandesa preta e branca, utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010

Linfócitos totais e linfócitos atípicos	Índice de correlação (r)	P
Linfócitos	- 0, 489	P = 0, 064
LA	0, 120	P = 0,67
SG	- 0, 256	P = 0,36
LM	- 0, 258	P = 0,35
ND	0, 402	P = 0,14

LA: porcentagem de linfócitos atípicos. SG: porcentagem de linfócitos apresentando sombras nucleares. LM: porcentagem de linfócitos monocitóides. LP: porcentagem de linfócitos picnóticos. PLASM: porcentagem de linfócitos plasmocitóides. ND: porcentagem de linfócitos com núcleo duplo.
 r = coeficiente de correlação
 P = valor de significância

As correlações entre a porcentagem de apoptose das células CD5⁺ (CD5⁺/annexin V-FITC⁺) e as contagens totais de linfócitos, linfócitos atípicos, sombra de Gümprrecht. Linfócito monocitóide e linfócito núcleo duplo nas 15 vacas, foram de r = - 0, 489 (P = 0, 064), r = 0, 120 (P = 0,67), r = - 0, 256 (P = 0,36), r = - 0, 258 (P = 0,35), r = 0, 402 (P = 0,14), respectivamente.

5.5 Correlação entre a contagem total de células e a porcentagem de apoptose dos animais infectados

Tabela 7 - As correlações entre a porcentagem de linfócitos CD5⁺ do sangue periférico sofrendo apoptose (CD5⁺/annexin V-FITC⁺) e a contagem total linfócitos das 10 vacas holandesa preta e branca, infectadas pela leucose enzoótica bovina utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010

Linfócitos totais e linfócitos atípicos	Índice de correlação (r)	P
Linfócitos	- 0, 511	P = 0,13
LA	0, 013	P = 0,97
SG	- 0, 260	P = 0,47
LM	- 0, 302	P = 0,40
ND	0, 369	P = 0,29

LA: porcentagem de linfócitos atípicos. SG: porcentagem de linfócitos apresentando sombras nucleares. LM: porcentagem de linfócitos monocitóides. LP: porcentagem de linfócitos picnóticos. PLASM: porcentagem de linfócitos plasmocitóides. ND: porcentagem de linfócitos com núcleo duplo.

r = coeficiente de correlação

P = valor de significância

As correlações entre a porcentagem de apoptose das células CD5⁺ (CD5⁺/annexin V-FITC⁺) e contagem total de células: linfócitos, linfócitos atípicos, sombra de Gümprrecht. Linfócito monocitóide e linfócito núcleo duplo nas 10 vacas consideradas positivas para LEB, foram de $r = - 0, 511$ ($P = 0,13$), $r = 0, 013$ ($P = 0,97$), $r = - 0, 260$ ($P = 0,47$), $r = - 0, 302$ ($P = 0,40$), $r = 0, 369$ ($P = 0,29$), respectivamente.

5.6 Proliferação de Linfócitos

O índice da proliferação linfocitária foi de zero, 153^a ($\pm 0, 029$), zero, 143^a ($\pm 0, 014$) e zero 083b ($+ 0, 014$) ($P = 0, 001$) nos animais negativos, AL e LP, respectivamente

5.7 Correlações entre o índice de proliferação linfocitária e as porcentagens das populações linfocitárias avaliadas no presente estudo

As correlações entre o índice de proliferação celular e as porcentagens das populações linfocitárias dos 15 animais estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Correlações entre o índice de proliferação celular e as porcentagens das populações linfocitárias das 15 vacas holandesa preta e branca, utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2010

Linfócitos totais e linfócitos atípicos	Índice de correlação	P
Linfócitos	- 0,22	P = 0,43
LA	- 0, 171	P = 0,54
SG	- 0, 051	P = 0,86
LM	- 0,47	P = 0, 078
ND	- 0, 052	P = 0,85

LA: porcentagem de linfócitos atípicos. SG: porcentagem de linfócitos apresentando sombras nucleares. LM: porcentagem de linfócitos monocitóides. LP: porcentagem de linfócitos picnóticos. PLASM: porcentagem de linfócitos plasmocitóides. ND: porcentagem de linfócitos com núcleo duplo.

r = coeficiente de correlação

P = valor de significância

As correlações entre o índice de proliferação linfocitária e as porcentagens de linfócitos, linfócitos atípicos, sombra de Gümprrecht, linfócito monocitóide e linfócito núcleo duplo dos 15 animais foram de $r = -0,22$ ($P = 0,43$), $r = -0,171$ ($P = 0,54$), $r = -0,051$ ($P = 0,86$), $r = -0,47$ ($P = 0,078$), $r = -0,052$ ($P = 0,85$), respectivamente.

Do mesmo modo, as correlações entre o índice de proliferação celular e a contagem total das populações linfocitárias dos 15 animais considerados infectados pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina estão apresentados na Tabela 9

Tabela 9 - Correlações entre o índice de proliferação celular e a contagem total das populações linfocitárias dos 15 animais considerados positivos para o vírus da Leucose Enzoótica bovina utilizados no presente estudo – São Paulo – 2010

Linfócitos totais e linfócitos atípicos	Índice de correlação (r)	P
Linfócitos	- 0,83	P = 0,0001
LA	- 0,004	P = 0,10
SG	- 0,318	P = 0,25
LM	- 0,522	P = 0,046
ND	- 0,122	P = 0,67

LA: porcentagem de linfócitos atípicos. SG: porcentagem de linfócitos apresentando sombras nucleares. LM: porcentagem de linfócitos monocitóides. LP: porcentagem de linfócitos picnóticos. PLASM: porcentagem de linfócitos plasmocitóides. ND: porcentagem de linfócitos com núcleo duplo.
 r = coeficiente de correlação
 P = valor de significância

As correlações entre o índice de proliferação linfocitária dos 15 animais e a contagem total das células: linfócitos, linfócitos atípicos, sombra de Gümprrecht, linfócito monocitóide e linfócito núcleo duplo foram de $r = -0,83$ ($P = 0,0001$), $r = -0,004$ ($P = 0,10$), $r = -0,318$ ($P = 0,25$), $r = -0,522$ ($P = 0,046$), $r = -0,122$ ($P = 0,67$), respectivamente.

Do mesmo modo, as correlações entre o índice de proliferação celular e as porcentagens das populações linfocitárias dos 10 animais considerados infectados pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10- Correlações entre o índice de proliferação celular e as porcentagens das populações linfocitárias dos 10 animais considerados positivos para o vírus da Leucose Enzoótica bovina utilizados no presente estudo – São Paulo – 2010

Linfócitos totais e linfócitos atípicos	Índice de correlação (r)	P
Linfócitos	0,094	P = 0,80
LA	- 0,090	P = 0,80
SG	0,063	P = 0,86
LM	- 0,503	P = 0,14
ND	0,085	P = 0,82

LA: porcentagem de linfócitos atípicos. SG: porcentagem de linfócitos apresentando sombras nucleares. LM: porcentagem de linfócitos monocitóides. LP: porcentagem de linfócitos picnóticos. PLASM: porcentagem de linfócitos plasmocitóides. ND: porcentagem de linfócitos com núcleo duplo.

r = coeficiente de correlação

P = valor de significância

As correlações entre o índice de proliferação linfocitária dos 10 animais positivos para LEB e as porcentagens de linfócitos, linfócitos atípicos, sombra de Gümprrecht, linfócito monocitóide e linfócito núcleo duplo, foram de $r = 0,094$ ($P = 0,80$), $r = - 0,090$ ($P = 0,80$), $r = 0,063$ ($P = 0,86$), $r = - 0,503$ ($P = 0,14$), $r = 0,085$ ($P = 0,82$), respectivamente.

Tabela 11- Correlações entre a proliferação de cada população celular com o índice de divisão celular da proliferação de linfócitos nos 10 animais infectados pelo VLEB – São Paulo – 2010

Linfócitos totais e linfócitos atípicos	Índice de correlação (r)	P
Linfócitos	- 0,826	P = 0,001
LA	- 0,424	P = 0,22
SG	- 0,282	P = 0,43
LM	- 0,522	P = 0,12
ND	- 0,019	P = 0,96

LA: porcentagem de linfócitos atípicos. SG: porcentagem de linfócitos apresentando sombras nucleares. LM: porcentagem de linfócitos monocitóides. LP: porcentagem de linfócitos picnóticos. PLASM: porcentagem de linfócitos plasmocitóides. ND: porcentagem de linfócitos com núcleo duplo.

r = coeficiente de correlação

P = valor de significância

As correlações entre o índice de proliferação linfocitária nos animais positivos para LEB e a contagem total de linfócitos, linfócitos atípicos, sombra de Gümprrecht, linfócito monocitóide e linfócito núcleo duplo dos 10 animais, foram de $r = -0,826$ ($P = 0,003$), $r = -0,424$ ($P = 0,22$), $r = -0,282$ ($P = 0,43$), $r = -0,522$ ($P = 0,12$), $r = -0,019$ ($P = 0,96$), respectivamente.

6 DISCUSSÃO

As atipias linfocitárias foram utilizadas no início do século passado como meio diagnóstico para LEB (TOIT, 1916; DU TOIT et al., 1916; GOTZE et al., 1954; URBANECK et al., 1969; GARCIA, 1989; BIRGEL JUNIOR, 1991; OLIVEIRA, 2009) e caíram em desuso com o surgimento e a facilidade de empregar diversas provas sorod diagnósticas, o que parecia obsoleto é atualmente empregado no estudo e no estadiamento de algumas doenças humanas (SIMON, 2003; e se torna convidativo reavaliar esses achados em buiatria, até por que representa uma prova com custo operacional reduzido e envolve uma doença de evolução crônica cuja célula mais acometida é o linfócito B (SCHWARTZ et al., 1979; KETTMANN et al., 1979).

Desta forma, o presente trabalho reavaliou algumas observações classicamente descritas, acrescidas de discretos aperfeiçoamentos como a estratificação dos grupos também usando ELISA, que possui maior sensibilidade, sendo mais recomendada para o diagnóstico, controle e erradicação desta enfermidade (MOLNÁR, 1999), que nos trabalhos anteriores eram predominantemente limitados ao emprego de IDGA (MILLER e VAN DER MAATEN, 1976; BIRGEL et al, 1981; BIRGEL et al., 1983) e confirmou as referências pretéritas tanto quanto a distribuição dos grupos Ferrer et al.(1977), Parodi (1987), Garcia (1996), Gillet et al. (2007).

A maioria dos estudos anteriores, não empregavam uma estratificação amostral semelhante a do presente estudo (negativo, AL e LP), sendo os animais classificados como negativos e positivos para leucose enzoótica bovina, portanto nesses estudos, as atipias foram relacionadas somente aos animais negativos e positivos. No presente trabalho as atipias predominaram nos animais dos grupos

com linfocitose persistente, dados que corroboram com por Birgel (1982 b), Garcia (1989), Cockerell; Reyes (2000).

Sintetizando essa face do estudo, das 56 vacas subdivididas nos três grupos experimentais, 40% dos animais infectados pra LEB apresentaram-se com LP, corroborando com os autores supracitados Ferrer et al.(1977), Parodi (1987), Garcia (1996), Gillet et al. (2007). Essa etapa, apesar da aparentemente não trazer novidades, mostrou-se muito interessante por referir que o comportamento, a distribuição da doença e respectivos estadiamentos, preserva suas características apesar da expectativa de modificação de antigenicidade que o vírus poderia ter sofrido nesses anos, em diferentes partes do mundo.

Na avaliação do número total de leucócitos o grupo LP apresentou maior número quando comparado aos outros grupos, isso se deve ao fato de que na LEB, observa-se leucocitose por linfocitose, principalmente de células B, corroborando com os achados de Garcia (1989), Birgel Junior (1991) e Azedo (2007).

Em relação à contagem diferencial dos leucócitos os valores absolutos de neutrófilos apresentaram diferença apenas entre os grupos AL e LP, apresentando o grupo LP um maior número dessas células, corroborando com Azedo (2007). Entre os três grupos, os achados foram os mesmos que Niepage (1953), que observou desvio a esquerda nessa afecção, como referido por Buonaccorsi et al. (1984) e Azedo (2007). Em contraposição, Birgel Junior (1991) observou que o número absoluto de neutrófilos nos animais infectados pelo VLEB não foram significativamente menores do que os observados nos bovinos sadios, demonstrando ser esse vírus um fator determinante de neutropenia. Já Garcia (1989) não encontrou nenhuma diferença entre as médias do número absoluto dos leucócitos polimorfonucleares granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) ou dos monócitos, obtidos do sangue dos animais reagentes ou não reagentes ao VLEB. Talvez essas contradições dos valores absolutos dos neutrófilos se dêem ao fato dos neutrófilos serem escassamente estudados nesta enfermidade, não havendo parâmetros, portanto, para tal avaliação.

Nos valores relativos dos neutrófilos houve diferença entre o grupo negativo e animais LP e animais AL e LP. Já entre o grupo negativo e os animais AL não foram observadas diferenças. Sendo que o grupo negativo apresentou maior número de neutrófilos circulantes, esse achado é concordante com Azedo (2007) e esta diferença pode advir do aumento expressivo de linfócitos B dos animais infectados manifestando LP. Ressalta-se que a triagem dos animais empregados nesse estudo envolveu critérios de homogeneização da população que compôs os grupos e o exame físico dos mesmos, minimizando a possibilidade do animal estar associando outra alteração física, até mesmo porque os valores se encontram dentro dos intervalos de referência propostos para a espécie.

Os valores relativos e absolutos dos eosinófilos não demonstraram diferença entre os grupos experimentais, tais dados são semelhantes aos encontrados por Garcia (1989) e Birgel Junior (1991). Informação essa plenamente justificável, uma vez que dentre as funções mais relevantes dessa célula estão a destruição dos parasitas, modulação da reação de hipersensibilidade e função pró-inflamatória, que não se aplicaria ao presente fenômeno (Schalm, 1957).

Os valores relativos dos monócitos avaliados no presente trabalho demonstraram diferença entre os animais AL e LP, sendo que os animais alinfocíticos apresentaram maior contagem de monócitos que os animais que apresentavam linfocitose persistente, embora esse aumento aparente não possa ser associado a uma monocitose, pois os valores desta célula ainda permanecem dentro dos valores de referência (Divers e Peek, 2008).

As contagens relativas e absolutas dos linfócitos demonstraram significância estatística nos grupos negativo e positivo de animais LP, e animais AL e LP. Sendo observado maior número de linfócitos nos animais LP, observação essa extremamente redundante uma vez que o aumento do número de linfócitos é a própria linfocitose, nesse caso um critério de inclusão amostral e composição do grupo. Esse dado foi o mesmo encontrado por Garcia (1989), Birgel Junior (1992) e Azedo (2007) e corrobora na classificação dos animais LP. Embora, Birgel, em 1982b, relatou a existência de animais infectados pelo VLEB que apresentavam

número de leucócitos e de linfócitos normais ou diminuídos representando uma fase inicial da virose, representada por leucopenia por linfopenia. Ainda, o presente autor refere que animais positivos pelo diagnóstico por IDAG portadores de leucocitose apresentaram linfocitose relativa e absoluta com evidente aumento de linfócitos atípicos.

Quanto às atipias observadas neste estudo, estas se limitaram a: sombras nucleares, linfócitos monocitóides e linfócitos com núcleo duplo. Esses achados foram semelhantes aos observados os observados por Garcia (1989), que ressaltou a importância dessas atipias no diagnóstico da LEB. O citado autor também encontrou que a sombra de Gümprsch, linfócito picnótico e linfócito plasmocitóide, mas considerou que esses últimos não seriam importantes no referido diagnóstico, pois também encontrou essas atipias em animais negativos para o vírus da leucose enzoótica bovina.

Embora essas primeiras avaliações tenham sido necessárias, mas previsíveis, a correlação das atipias, às avaliações de proliferação e apoptose representam o epicentro do presente estudo.

Considerando que uma correlação entre variáveis pode sugerir uma relação de causa e efeito entre elas, o presente estudo buscou correlacionar as diferentes atipias aos índices de apoptose e proliferação sem a pretensão de estabelecer uma relação causal.

Observou-se uma menor proliferação de linfócitos nos animais infectados pelo VLEB manifestando LP, associado a uma menor apoptose de células CD5+, dados que corroboram com Debacq et al. (2003), Florins et al. (2007) e Florins et al. (2008), que referiram menor proliferação de linfócitos associado à redução da morte celular nos animais infectados pelo VLEB manifestando LP. Isto pode acontecer pelo fato de que a proliferação pode ocorrer em outros sítios como linfonodos, placas de Peyer ou medula óssea. Debacq et al. (2004) sugeriu que a maior proliferação linfocitária em bovinos infectados pelo VLEB pode se restringir apenas aos estágios iniciais da infecção, e posteriormente a LP persiste pela modulação do processo

apoptótico pelo vírus como descrito por Schwartz-Cornil et al. (1997); Cantor et al. (2001), Florins et al. (2007) e Gillet et al. (2007).

Em estudo recente Azedo (2010), avaliado a reposta imunitária de animais naturalmente infectados, empregou uma estratificação amostral semelhante a do presente estudo (negativo, alinfocitóticos e com linfocitose persistente), já proposta em trabalho anterior desse mesmo autor Azedo (2007). Essa divisão dos positivos, apesar de não incluir a forma tumoral que clinicamente apresenta a forma de maior gravidade, busca compreender melhor o estadiamento da doença e identificar disfunções já descritas predominantemente nos animais com linfocitose persistente (AZEDO et al., 2008), agora sob a ótica das atipias e da proliferação e apoptose de células CD5⁺⁺.

Cantor et al. (2001) encontraram em bovinos infectados redução do processo apoptótico em animais infectados manifestando LP, sugerindo que embora a redução seja relativamente pequena *in vitro*, os efeitos biológicos poderiam ser maiores. Takahashi et al. (2004) relataram que células B infectadas que não expressavam o VLEB eram menos propensas a sofrer apoptose *ex-vivo*.

A persistência da infecção ocorre possivelmente associada à diferença da expressão de antígenos virais nas células infectadas que resulta na eliminação das células que os expressam (FLORINS et al., 2007; GILLET et al., 2007). Este fato é de extrema importância visto que logo após a infecção, a atividade da resposta humoral e citotóxica são capazes de abolir a replicação viral, permitindo apenas a expansão clonal das células portadoras do provírus, o que justificaria a maior proliferação de linfócitos se restringir apenas aos estágios iniciais da infecção. Podendo sugerir que desenvolvimento da LP deve-se á redução da apoptose pelas células B, e a maior proliferação linfocitária pode se restringir apenas ao estágio inicial do desenvolvimento da LP.

Azedo (2010), no estudo já citado, referiu que as concentrações séricas de citocinas de perfil Th 1 (I-12 e INF- γ) foi maior em amostras sanguíneas de animais alinfocitóticos, enquanto as concentrações séricas de citocinas de perfil Th 2 (IL-10 e

INF- α) foram maiores em amostras sanguíneas de animais infectados manifestando linfocitose persistente. Nessa investigação também foi observado um menor índice de apoptose no grupo LP, embora tenha sido avaliado o percentual de leucócitos sofrendo apoptose enquanto nesse estudo, o índice de apoptose baseou-se nas células CD5⁺.

Embora a dinâmica celular ainda necessite ser mais bem elucidada em bovinos manifestando a infecção, o aumento do número de linfócitos circulantes poderia ser gerado por alterações no potencial apoptótico das células infectadas.

Cabe salientar, que neste estudo foram utilizadas técnicas de marcação de DNA, que também proporcionam o estabelecimento do índice de mortalidade celular. No entanto, esse valor não corresponde à morte de toda população, mas apenas de células marcadas, com isso, Asquith et al. (2006b) advertem que o resultado não é representativo da média da taxa de morte, mas apenas representa o desaparecimento de células que se dividiam, durante o período de marcação.

Sabe-se que os vírus desenvolvem estratégias para neutralizar a resposta apoptótica das células do hospedeiro e acredita-se que a modulação da apoptose, associada ou não ao aumento da taxa de proliferação celular, possa ser componente fundamental na persistência viral e na progressão para linfocitose induzida pelo retrovírus.

Uma importante via protetora intracelular contra o peróxido de hidrogênio é a da glutathiona. É também citado que mudanças na produção de glutathiona reduzida (GSH) / oxidada (GSSH) estão associadas com importantes eventos redox que iniciam a resposta proliferativa ou apoptótica, sendo que a redução da GSSH foi correlacionada com o processo apoptótico. A GSH, por exemplo, é transportada para o meio extracelular nos processos apoptóticos celulares e a inibição deste processo pode dificultar ou retardar o processo apoptótico (GHIBELI et al., 1998).

Em ovinos infectados experimentalmente, manifestando LP, não foi observada alteração nos processos de morte celular, Debacq et al., (2002). Já

Bouzar et al., (2009) observaram que linfócitos B obtidos de ovinos infectados apresentaram menores índices de apoptose *in vitro*. Esses autores observaram evidências demonstrando que baixas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) têm papel chave na diminuição dos índices de apoptose, induzida pelo VLB.

Inicialmente as correlações foram estabelecidas em todos os animais, ou seja, desconsiderando a infecção.

Na análise dos valores relativos da correlação entre a apoptose de células CD5⁺ (CD5⁺/annexin V-FITC⁺) e a porcentagem das populações linfocitárias entre os 15 animais, observou-se que a apoptose tem uma dependência muito fraca com os linfócitos, linfócitos atípicos e com a atipia denominada núcleo duplo, sendo que só teve significância nos casos dos linfócitos núcleo duplo, o que já não foi encontrado nas demais populações celulares, como: linfócitos e linfócitos atípicos. Em relação (valores absolutos) à contagem total de linfócitos e a porcentagem de células CD5⁺ (CD5⁺/annexin V-FITC⁺), sofrendo apoptose nos 15 animais, também houve correlação com dependência muito baixa entre a apoptose e os linfócitos atípicos e linfócitos com núcleo duplo.

Considerando apenas os animais infectados, nos valores relativos, houve correlação com dependência muito fraca entre a apoptose de células CD5⁺ (CD5⁺/annexin V-FITC⁺) e a porcentagem de linfócitos, linfócitos atípicos e núcleo duplo. Nos valores absolutos, a contagem de linfócitos totais nas 10 vacas infectadas pelo VLEB e a porcentagem de células CD5⁺ (CD5⁺/annexin V-FITC⁺) sofrendo apoptose foi observado o mesmo: dependência muito baixa entre a apoptose e os linfócitos atípicos e da apoptose com os linfócitos núcleo duplo e as demais populações celulares com uma correlação inversamente proporcional.

Os mecanismos pelos quais ocorre a expansão celular ainda são obscuros. Enfatiza-se que o provírus do VLB integra o genoma das células infectadas de forma aleatória, e portanto não transforma as células por mutagênese insercional (KETTMANN et al., 1983; GREGOIRE et al., 1984). Contudo, uma interferência na

reposta apoptótica de células infectadas, associada ou não a um aumento na taxa de proliferação celular podem contribuir tanto para a determinação da LP, quanto para a persistência viral (DEBACQ et al., 2001). Na homeodinâmica dos linfócitos, que ocorre em animais infectados pelo VLB, pode resultar de uma perturbação do complexo equilíbrio entre diferentes fatores, incluindo a proliferação celular, diferenciação, morte e/ou recirculação entre o sangue periférico e os órgãos linfóides secundários.

Florins et al. (2008) afirmaram que a proliferação de linfócitos é aumentada em ovinos e diminuída em bovinos, em manifestações semelhantes da enfermidade, revelando diferenças na dinâmica celular entre as duas espécies hospedeiras do VLB.

Entretanto em um trabalho de Azedo (2009) demonstrou que bovinos naturalmente infectados pelo VLEB manifestando LP apresentam menor porcentagem de linfócitos sofrendo processo de apoptose, fato que deve contribuir para o estabelecimento da LP, porém índices de proliferação de linfócitos variam em função do período em que ocorreu o estímulo antigênico, podendo justificar a divergência de dados verificados por outros autores.

Na análise dos valores relativos da correlação da proliferação celular e a porcentagem das populações linfocitárias entre os 15 animais, observou-se que a proliferação tem uma correlação inversamente proporcional com os linfócitos, linfócitos atípicos, sombras de Gümprsch, linfócitos monocitóides, e linfócitos com núcleo duplo. O mesmo ocorreu no caso dos valores absolutos da contagem total das células destes 15 animais, todas as populações celulares mostraram uma correlação inversamente proporcional com a proliferação, sendo que foi observado significância entre a proliferação e os linfócitos e a proliferação e os linfócitos monocitóides.

No caso das 10 vacas infectadas pelo VLEB nenhuma das células estudadas apresentou correlação positiva e sim uma correlação com uma dependência muito

baixa entre a proliferação e a porcentagem de linfócitos, porcentagem de linfócitos do tipo sombra de Gümrescht, porcentagens de linfócitos com núcleo duplo.

Nos valores absolutos da contagem total das células, as correlações entre a proliferação de cada população celular com o índice de divisão celular da proliferação de linfócitos nos 10 animais infectados pelo VLEB, observou-se que todas as células estudadas apresentaram uma correlação inversamente proporcional.

7 CONCLUSÕES

No presente estudo conclui-se que:

- As atipias linfocitárias não são exclusivas de animais naturalmente infectados pela leucose enzoótica bovina, embora predominam a predominância destes nos animais manifestando linfocitose persistente.
- As atipias linfocitárias mais comumente encontradas foram: sombra de Gümptescht, linfócitos monocitóides e linfócitos com núcleo duplo, embora possuam relações diversas quanto a proliferação e a apoptose.
- A linfocitose persistente não pode ser associada à proliferação que por sua vez foi inversamente proporcional a atipia classificada como linfócito monocitóide.
- A manifestação da LP está relacionada à redução do processo apoptótico dos linfócitos B e a atipia classificada como núcleo duplo foi a que melhor se associou ao fenômeno.

REFERÊNCIAS

ABREU, J. M. G. **Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos anti-Vírus da Leucose Bovina em animais criados na bacia leiteira de Fortaleza, Estado do Ceará.** 1993. 75 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

ALENCAR FILHO, R.A.; RODRIGUES, F.M.; VIANNA, W.O. Alterações do leucograma de bovinos positivos à imunodifusão para leucose enzoótica. **O Biológico**, São Paulo, 47: 103-106, 1981.

AZEDO, M. R. **Influência da leucose enzoótica bovina na atividade oxidativa de leucócitos.** 2007. 151 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BALESTIERE, F.M.P. **Imunologia.** Barueri: Manole, 2006. 840 p.

BENDIXEN, H.J. Untersuchungen über die Rienderleukose 3. Über die kontrolle von Leukosebestände mittels hämatologischer Untersuchungsmethoden. **Nordisk Veterinarmedizin**, 11: 7733-758, 1959.

BENDIXEN, H.J. Untersuchungen über die Tanderleukose in Dänemark II. Pathogenese und Enzoologie der übertragboren Rinderleukose. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, 67: 57-63, 1960.

BIRGEL, E. H.; ARAÚJO, L. M.; REICHMANN, C. E.; ARAÚJO, W. P.; D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M. Influência da premunicação no quadro leucocitário de bovinos da raça Holandesa importados do Canadá. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. Anais... São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1974. p. 161-162.

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

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

BIRGEL JUNIOR, E. H. **Hemograma de bovinos (*Bos taurus*, Linnaeus, 1758), da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. Influência de fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose bovina.** 1991. 267 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bovina) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

BRENNER, J.; AVIDAR, J.; LAHAV, D. Bovine leukemia virus infection should also be considered in the differential diagnosis of nonspecific clinical manifestations. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 62, n. 1, p. 30-31, 2007.

BUEHRING, G. C.; KRAMME, P. M.; SCHULTZ, R. D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. **Laboratory Investigation**, v. 71, n. 3 p. 359-65, 1994.

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.

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

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

CHI, J.; VANLEEUEWEN, J. A.; WEERSINK, A.; KEEFE, G. P. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 55, n.2, p.137-153, 2002.

CLARKE, P.; TYLER, K. L. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 144-155, 2009.

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

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

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

DACHUAN, X.; JIAZHOU, Z.; CHAO, L.; YANYUN, H. Formulation and application of hematology key for diagnosis of bovine leukosis of Holstein- Frisian cows in Wuhan Region. In :**Congresso Mundial de Buiatria**, 15, Palma de Maiorca, 1988. **Anais**. P.875-880.

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.

DEPELCHIN, A. Hématologie animale. III. L' hémogramme normal des espèces bovine et canine. **Annales de Médecine Vétérinaire**, **101**: 340-370, 1957.

DE GIUSEPPE, A.; FELIZIANI, F.; RUTILI, D.; DE MIA, G. M. Expression of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoprotein (gp51) by Recombinant Baculovirus and Its Use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 1, p. 147-51, 2004.

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

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

DIVERS, T. J.; PEEK, S. F. **Rebhun's disease of dairy cattle**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2008.

DONOVAN, R. M. **Retroviridae**. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. Microbiologia Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 411-28.

FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. (Eds). Virus Taxonomy VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, 1162 p. 2004.

FIALA, M.; HEINER, D.C.; TURNER, J.A.; ROSENBLOOM, B.; GUZE, L.B. Infections mononucleoses and mononucleoses syndromes. Clinicall virological and immunological features. **The Western Journal of Medicine**. v.126, p. 445-59, 1967.

FERRER, J. F. Bovine Leukosis: Natural Transmission and Principles of Control. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 175, n. 12, p. 1281-90, 1980.

FURTADO, V.M.G. **Imunofenotipagem em Leishmaniose cutânea – imunohistoquímica como ferramenta para estudar a reação imune e a apoptose em uma série de pacientes com Leishmaniose cutânea no Distrito Federal**. 2006. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Brasília, UnB.

FUKAI, K.; SATO, M.; KAWARA, M.; HOSHI, Z.; UENO, S.; CHYOU, N.; AKASHI, H. A case of an embryo transfer calf infected with bovine leukemia virus from the recipient cow. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**. Reihe B, v. 46, n. 8, p. 511-5, 1999.

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.

GARCIA, M.; BASTOS, P. A. S.; BARROS FILHO, I. R.; DELLA LIBERA, A. M. M. P.; COUTINHO, S. D. A.; RAMOS, M. C. C.; LOURENÇO, A.; SILVA, M. M. Efeito da infecção pelo vírus da leucose na ocorrência de mastite em bovinos. **A Hora Veterinária**, v. 15, n. 88, p. 41-44, 1995.

GEORGE, J.W. Bovine lymphocyte counts key to disease recognition and control. **Veterinary Clinical Pathology**. V.36, n.3, 2007.

GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUX, M.; BURTEAU, C.; NIGRO, A.; VANDERMEERS, F.; BALON, H.; BOUZAR, A. B.; DEFOICHE, J.; BURNY, A.; REICHERT, M.; KETTMAN, R.; WILLEMS L. Mechanisms of leukomogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, 4:18, 2007

GONZÁLEZ, E. T.; BONZO, E. B.; ECHEVERRÍA, M. G.; LICURSI, M.; ETCHEVERRIGARAY, M. E. Enzootic bovine leukosis: development of an indirect enzyme linked immunosorbent assay (I-ELISA) in seroepidemiological studies. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 37-42, 1999.

GOTZE, R.; ROSENBERGER, G.; ZIEGENHAGEN, G. Die Leukose des Rindes. In: Hämatologische und Klinische Diagnose. **Monatshefte für Veterinärmedizin**, 9: 517-526, 1954.

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

HAWKINS, E. D.; HOMMEL, M.; TURNER, M. L.; BATTYE, F. L.; MARKHAM, J. F.; HODGKIN, P. D. Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2057-2067, 2007.

HOPKINS, S. G.; DIGIACOMO, R. F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v. 13, n. 1, p. 107-128, 1997.

JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febinger, 1986. 1221 p.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993, 989 p.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, P.T.M; SHLOMCHIK, M.S. *Imunologia – o sistema imune na saúde e na doença*. 6 ed. Porto Alegre: Atmed, 2007. 824 p.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia Veterinária*. 6 ed. São Paulo: Manoli, 2000.

JULIANO, R.S. Aspectos **Sanitários e imunológicos de bovinos da raça curraleiro**. 2006. 107 f. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) – Universidade Federal de Goiás, UFG.

KAMPEM, A.H.; OLSEN, I.; TOLLESRUUD, T.; STORSET, A.K.; LUND, A. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.113, n. 1-2, p.53-63, 2006.

KETTMANN, R.; MEUNIER-ROTIVAL, M.; CORTADAS, J.; CUNY, G.; GHYSDAEL, J.; MAMMERICKX, M.; BURNY, A.; BERNARDI, G. Integration of bovine leukemia virus DNA in the bovine genome. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 76, n. 10, p. 4822-4826, 1979.

KETTMANN, R.; COUEZ, D.; GRÉGOIRE, D.; BURNY, A. Leukemogenesis by Bovine Leukemia Virus. In: BURNY, A.; MAMMERICKX, M. (Ed.). **Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus**. Boston: Martinus Nijhoff, 1987. p. 153-160.

KLINTEVALL, K.; FUXLER, L.; FOSSUM, C. Bovine leukemia virus: early reflections in blood after experimental infection of calves. **Comparative Immunology, Microbiology and Infections Diseases**, v. 20, n.2, p. 119-130, 1997.

KNUTH, P. VOLKMANN, O. Untersuchungen über die Lymphozytomatose des Rindes. **Zeitschrift für Infektionskrankheiten, Parasitäre- Krankheiten und Hygiene der Haustiere**, 17; 393-467, 1916.

KRAMER, J. W. Normal hematology of cattle, sheep, and goats. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C (Ed). **Schalm's veterinary hematology**. 5. Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. P. 1075 – 1084.

KULBERG, S.; BOYSEN, P.; STORSET, A, K. Reference values for relative numbers of natural killer cells in cattle blood. **Developmental and comparative Immunology**. Elmsford, v. 28, n. 9, p. 941-948, 2004.

LEVY, D.; KETTMANN, R.; MARCHAND, P.; DJILALI, S.; PARODI, A. L. Selective tropism of bovine leukemia virus (BLV) for surface immunoglobulin-bearing ovine B lymphocytes. **Leukemia**, v. 1, n. 5, p. 463-465, 1987.

LYONS, A. B.; PARISH, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 171, p. 131-137, 1994.

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, p.147-154, 2000.

LUCAS, M. H.; ROBERTS, D. H.; BANKS, J. Shedding of bovine leukosis virus in nasal secretions of infected animals. **The Veterinary Record**, v. 132, n.11, p. 276-278, 1993.

MAMMERICKX, M. ; LORENZ, R.J.; STRAUB, O.C.; DONELLY, W.J.C.; FLENSBURG, J.C.; GENTILE,G.; MARKSON, L.M.; RESSANG, A.A.; TAYLOR, S.M. Bovine hematology. III. Comparative breed studies on the leukocyte parameters of several European cattle breeds as determined in the common reference laboratory. **Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B**, 25: 257-267, 1978 a.

MAMMERICKX, M. ; LORENZ, R.J.; STRAUB, O.C.; DONELLY, W.J.C.; FLENSBURG, J.C.; GENTILE,G.; MARKSON, L.M.; RESSANG, A.A.; TAYLOR, S.M. Bovine hematology. IV. Comparative breed studies on the erythrocyte parameters of 16 European cattle breeds as determined in the common reference laboratory. **Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B**, 25: 484-498, 1978 b.

MEAS, S.; USUI, T.; OHASHI, K.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. **Veterinary Microbiology**, v. 84, n. 3, p. 275-82, 2002.

MELO, L. E. H. **Leucose enzoótica dos bovinos: Prevalência da infecção em rebanhos leiteiros criados no agreste meridional do estado de Pernambuco**. 1991. 124 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bovina) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

MELO, L. E. H. **Avaliação da intercorrência entre leucose enzoótica, tuberculose e leptospirose dos bovinos em rebanhos produtores de leite C do Estado de São Paulo**. 1999. 127 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MERKT, H.; GIUDICE, J.C.O.; MÜLLER, J.A. Leucose bovina: concepção moderna e primeira verificação da doença no Rio Grande do Sul. **Revista da Escola de Agronomia e Veterinária do Rio Grande do Sul**, 2: 7-19, 1959.

MILLER, J. A.; MILLER, L. D. ; OLSON, C.; GILLETTE, K. G.; Virus-like Particles in Phytohemagglutinin-stimulated Lymphocyte Cultures with Reference to Bovine Lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1297-1305, 1969.

MIRSKY, M. L.; OLMSTEAD, C. A.; DA, Y.; LEWIN, H. A. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. **J. Virol.**, v. 70, n. 4, p. 2178-2183, 1996.

MOLLOY, J. B.; WALKER, P. J.; BALDOCK, F. C.; RODWELL, B. J.; COWLEY, J. A. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine leukaemia virus p24 antibody in cattle. **Journal of Virological Methods**, v. 28, n. 1, p. 47-57, 1990.

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

NAIF, H. M.; BRANDON, R. B.; DANIEL, R. C.; LAVIN, M. F. Bovine leukaemia proviral DNA detection in cattle using the polymerase chain reaction. **Veterinary Microbiology**, v. 25, n. (2-3), p. 117-29, 1990.

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

NAOUM, P.C. Avanços tecnológicos em hematologia laboratorial. **Revista Brasileira de Hematologia e hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.23, n.2, p.15-23, 2001.

NIEPAGE, H. Erhebungen über die Rinderleukose und Untersuchungen des Blutbildes. **Monatshelfte für Veterinärmedizin**, 8: 21-25, 1953.

OLIVEIRA, E.C.L.; PONTES, E.R.J.C.; CUNHA, R.V.; FRÓES, I.B.; NASCIMENTO, D. Alterações hemtológicas em pacientes com dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.42, n.6, p-682-85, 2009.

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

OIE.Health Standards. Terrestrial Animal Health Code 2003. **Enzootic bovine leukosis**. [s.l.; s.n., 2003]. Disponível em <http://www.oie.int>. Acesso em 20 de fevereiro de 2010.

PARODI, A. L. Pathology of Enzootic Bovine Leukosis: Comparision with the Sporadic Form. In: BURNY, A.; MAMMERICKX, M. (Ed.). Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus. **Boston: Martinus Nijhoff**, 1987. p. 15-49.

PEITZMEYER, F. Die Leukose des Rindes ein Literarischer Überblick. Berlin, 1940. **Inaugural Dissertation – Doktors der Vetreinär – medizin – Friedrich – Wilhelms – Universität**.

PIENING, C. Zur Kenntnis des Blutbildes bei der Rinderleukose. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, 50: 580-582, 1934.

REICHERT, M.; STEC, J. Simultaneous Use of two Primer Pairs increases the Efficiency of Polymerase Chain Reaction Assay in the Diagnosis of Bovine Leukemia Virus Infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 543-7, 1999.

RIBEIRO, A. G. P. Estudos hematológicos sorológicos e citoquímicos em animais reagentes e não reagentes à Leucose Bovina. **Arquivo Fluminense de Medicina Veterinária**, Niterói, v. 2, p. 121-122, 1987

ROITT, I. Imunologia. 7 ed. São Paulo: Editora Manole, 2003, 481 p.

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

SAMPAIO, J. B. M. Estatística aplicada à experimentação. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.

SCARCI, R. M.; BENTO, C.L.; MEDEIROS, E. L.; GUARENTI, P. J. Avaliação dos testes sorológicos e hematológicos no diagnóstico da Leucose Bovina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 17. 1980, Fortaleza. **Anais**. Fortaleza: 1980. p. 137.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the *California Mastitis Test*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 130, n. 5, p. 199-207, 1957.

SCHWARTZ, I.; BENSAD, A.; POLACK, 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. 4589-96, 1994.

SCHWARTZ, I.; LEVY, D. Pathobiology of bovine leukemia virus. **The Veterinary Research**, v. 25, n. 6, p. 521-36, 1994.

SCHÖTTLER, F.; SCHÖTTLER, H. Über die Ätiologie und Therapie der aleukämischen Lymphadenose des Rindes. **Berliner Tierärztliche Wochenschrift**, 50: 497-502, 1934.

SILVA, E.B.; GROTO, H.Z.W.; VILELA, M.M.S. Aspectos clínicos e o hemograma de crianças expostas ao HIV- 1: comparação entre pacientes infectados e sor-reversores. **Jornal de Pediatria**. V. 77, n. 6, 2001.

SILVA, S. V. **Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos anti-Vírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos cruzados – holandês/zebu e em animais da raça Pé-duro, criados no Estado do Piauí**. 2001. 176 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SIMÕES, S. S. D. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos anti-Vírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos leiteiros do Estado da Paraíba. 1998. 118 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SINGH, V.P.; BANSAL, M.P. Studies on bovine leukosis. I. Significance of hematological values for detection of bovine leukosis in Indian cross-bred cattle. **Indian Veterinary Journal**, 62: 819-824, 1985.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia humana**. 2 ed. São Paulo. Editora Manole Ltda. 2001, 408 p.

STÖBER, M.; HEUBNER, D. Beitrag zur Unterscheidung der Monozyten von Lymphozyten in Blutaussstrich von Rind (Morphologie, Naphthol- AS-Esterase). **Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe A**, 14: 554-569, 1967.

SUETAKE, H.; RATAN SAHA, N.; ARAKI, K.; AKATSU, K.; KIKUCHI, K.; SUZUKI, Y. Lymphocyte surface marker genes in fugu. **Comparative Biochemistry and Physiology, Londres, Part D**, v.1, n.1, p. 102-108, 2006.

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

THORMÄLEN, 1935 apud NIEPAGE, 1953. p. 23.

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

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

TOIT, P.J. Beitrag zur Morphologie des normalen und leukämischen Rinderblutes. **Inaugural Dissertation**. Berlin, 1916.

TOLLE, A. Zur Beurteilung quantitative hämatologischer Befunde im Rahmen der Leukose- Diagnostik beim Rind. **Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B, 12**: 281-290, 1965.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometry detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin-V. **Journal of Immunology Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.

URBANECK, D. Zwei morphologisch differente Lymphozyternarten beim Rind. **Archiv Experimentelle Veterinärmedizin**, 21: 795-800, 1967.

WEBER, W. T. Hematologic aspects of bovine lymphosarcoma. **Annals of the New York Academy of Science**, 108: 1270-1283, 1963.

WELLMAN, M.L. Lymphoproliferative disorders of large granular lymphocytes. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (Ed). **Schalm's veterinary hematology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 2000. P. 641-647.

WINQVIST, G. Die Hämatologie der Tierleukosen? **Monatshefte für Veterinärmedizin**, 13: 161-164, 1958.

WIKSTROM, I. Molecular genetics of B- and T lymphocyte development. 2006. 72 f. Tese (Doutorado em Genética Médica) – Umea University, USA.

WITTMANN, W. & SEILS, H. Beiträge zur Diagnose und Bekämpfung der enzootischen Rinderleukose. 2. Die Entwicklung der Lymphozytengesamtzahl bei und experimentell induzierter Rinderleukose. **Archiv für experimentelle Veterinärmedizin**, 23: 775-782, 1969.

WYATT, C. R.; MADRUGA, C.; CLUFF, C.; PARISH, S.; HAMILTON, M. J.; GOFF, W.; DAVIS, W. C. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 40, n. 3, p. 187-199, 1994.

ZIEGENHAGEN, G.; DÖHMEN, H. Über den Wert der morphologischen Beurteilung der Leukozyten für die Diagnose der Rinderleukose. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, 62: 532-534, 1955.