MILTON RICARDO AZEDO

**Influência do vírus da leucose bovina na resposta imunitária
de animais naturalmente infectados**

São Paulo

2010

MILTON RICARDO AZEDO

**Influência do vírus da leucose bovina na resposta imunitária de
animais naturalmente infectados**

Tese 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 Doutor em
Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Alice Maria Melville Paiva Della Libera

São Paulo

2010

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.2260
FMVZ

Azedo, Milton Ricardo

Influência do vírus da leucose bovina na resposta imunitária de animais
naturalmente infectados / Milton Ricardo Azedo. -- 2010.
160 f. : il.

Tese (Doutorado) - 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. Bovinos. 2. Leucose enzoótica bovina. 3. Resposta imunológica. 4. Vacinação.
5. Febre aftosa. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Alterações nas subpopulações de linfócitos circulantes em bovinos de corte naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos, criados no Estado de São Paulo", protocolo nº687/2005, utilizando 1000 bovinos (coleta de sangue), 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 Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Alterations in blood lymphocyte subpopulations of naturally enzootic bovine leucosis infected beef cattle, raised in São Paulo", protocol number 687/2005, utilizing 1000 bovines (sample blood), under the responsibility of Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 20 de maio de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: AZEDO, Milton Ricardo

Título: Influência do vírus da leucose bovina na resposta imunitária de animais naturalmente infectados

Tese 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 Doutor em
Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A minha família.

*Meus pais, Laurinda ("Dona Lalá") e Milton ("Seu Mimi"),
meu irmão, Carlos Eduardo Azedo ("Dudu"),
meus sobrinhos, Rafael e Fernanda,
meus tios, tias, primos e primas.*

Motivo e inspiração para seguir.

AGRADECIMENTOS

No início de 2003, resolvi retornar a São Paulo para ter a oportunidade de ficar mais próximo de meus pais, à época, já com idade. A experiência dos 13 anos na Amazônia como, principalmente, buiatra, não seria inerente na busca por uma recolocação nesta cidade... e eu estava ciente disto. Mas, em mim, já havia surgido a vocação para a docência... uma possibilidade. No entanto, seria necessária a busca por aperfeiçoamento, aprender a ensinar... a responder e a perguntar. Seriam prementes Mestrado e Doutorado.

Finda mais esta etapa, certo é que, a cada dia, ainda há muito que aprender, mas a vocação que surgira tornou-se paixão...

Muitos foram fundamentais para que estes últimos anos fossem agradáveis e produtivos. Em especial, agradeço:

À minha querida Amiga, Irmã e **Orientadora, Profª Drª Alice Maria Melville Paiva Della Libera**, para sempre “**minha chefinha**”. Essencial... especial. Pelas conversas e conselhos, pelos ensinamentos, pela paciência, pela confiança, pelos exemplos de profissional prestativa e dedicada, de mãe, filha e esposa, sou eterna e incondicionalmente grato.

À valiosa equipe formada pelos Médicos Veterinários Pós-Graduandos **Maiara Garcia Blagitz, Camila Freitas Batista, Tatiana de Rezende Spínola, Melissa Hartman, Claudia Pestana Ribeiro, Bárbara Gabriela Soares Sanches e Fernando Nogueira de Souza**. Pessoas tão heterogêneas e tão intensas e dedicadas. Nossas pesquisas, nossos trabalhos são fruto do esforço de cada um de nós. Nosso fim... o desenvolvimento de todos. Obrigado por tudo!

Aos diletos Professores Doutores do Departamento de Clínica Médica, **Archivaldo Reche Júnior, Carla Bargi Belli, Carlos Eduardo Larsson, Cássio Xavier de Mendonça Júnior, Denise Saretta Schwartz, Eduardo Harry Birgel Júnior, Enrico Lippi Ortolani, Fernando José Benesi, Liliam Gregory, Márcia Mery Kogika, Maria Cláudia Araripe Sucupira, Maria Helena Akao Larsson, Mitika Kuribayashi Hagiwara, Raquel Yvonne Arantes Baccarin, Silvia Regina Ricci Lucas e Wilson Roberto Fernandes**, por proporcionar adoráveis momentos de amizade e confiança. Por seus ensinamentos, disposição e carinho. Pela alegria da convivência e por todo incentivo, agradeço!

Ao **Prof. Dr. Wanderley Pereira de Araújo**, amigo sincero que partiu, exemplo que permanece...

Especialmente ao **Prof. Dr. Ubiraem Mario Schalch**, certamente o Médico Veterinário mais generoso que eu já conheci. Graças aos seus ensinamentos, tornei-me mais seguro. Graças a sua confiança, tornei-me profissional. Graças a sua benevolência, este trabalho pôde ser realizado. A você, sempre serei grato e renderei, eternamente, homenagem e respeito.

Aos grandes amigos, funcionários desta Casa: **Cláudia R. Stricagnolo, Maria Aparecida de Freitas, Adelaide F. J. Borges, Clara S. Mori, Carmem S. Ribeiro, Marly E. F. de Castro, Maria Helena F. Silva, Janilda S. Costa, Geraldo N. Thezi e Silvana R. Guedes**

que, com um sorriso, um gesto, uma palavra, tornaram meus dias mais agradáveis. Pela convivência e pela colaboração, eu agradeço.

*Às amigas do Departamento de Pós-Graduação da FMVZ-USP e da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice, pela amizade e colaboração na confecção desta tese. E aos amigos da Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes e do Hospital Veterinário de Pirassununga, da FMVZ-USP, **Edison, Francisco, Luis, Cecília, Zico, Paulão**, pela ajuda, sempre plena, e pela convivência, sempre simpática e doce.*

Ao Prof. Dr. Luis Carlos de Sá-Rocha, por permitir o uso do Laboratório de Neuroimunomodulação, do Departamento de Patologia Experimental e Comparada da FMVZ-USP. Velha amizade, novas possibilidades e a permanente colaboração. Obrigado!

*Ao **Prof. Dr. Flavio Vieira Meirelles**, pela amizade, pela confiança e por disponibilizar o Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo; bem como aos seus orientados, **Fabiana Bressan** e **Moyses S. W. Miranda**, pela ajuda pronta, essencial e incondicional.*

*Aos companheiros do curso de Pós-Graduação... **todos, sem exceção!!** Por tornar meus dias mais ricos e aprazíveis. Por aturar um "tio", às vezes "azedo" e ranzinza, mas, sempre, grato por poder estar junto de vocês. Pela troca de informações e experiências. Injusta troca, pois recebi bem mais do que dei. Obrigado... sem sua constante companhia teria sido bem mais difícil.*

*Especialmente ao seletor Médico Veterinário **Prof. Fabio Celidonio Pogliani**, pela amizade sincera, companhia constante e pela colaboração direta na confecção deste trabalho, à querida Médica Veterinária **Dra. Mônica Sakai**, pela boa vontade e pela valiosa ajuda técnica e à especial **Profa. Ana Carolina Rusca Correa Porto**, pelo carinho e pela disposição em ouvir.*

Aos colegas docentes e aos alunos da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIMES, pelo apoio e companheirismo.

*Aos **responsáveis das propriedades rurais**, que abriram suas portas, e a seus **funcionários**, que muito auxiliaram na coleta das amostras para a realização deste trabalho; e aos **animais** tão involuntariamente envolvidos nesta pesquisa, motivo da certeza e do orgulho de uma profissão bem escolhida!*

*À FAPESP – **Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pela concessão de Auxílio Pesquisa (Processo nº 2005/00643-2) e Bolsa de Doutorado (Processo nº 2007/57591-0), imprescindíveis para a implementação deste trabalho.*

Acima de tudo, a minha família (meus pais, meu irmão, minha cunhada, sobrinhos, tios e primos). Mais que incentivadores, carinhosos. Mais que torcedores, cúmplices. Mais que queridos, essencialmente amados.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho...

...meu sincero, muito obrigado!

A vida é uma sequência de consequências...

RESUMO

AZEDO, M. R. **Influência do vírus da leucose bovina na resposta imunitária de animais naturalmente infectados.** [Influence of enzootic bovine leukosis on immune response of naturally infected cattle]. 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) é uma enfermidade neoplásica, infecto-contagiosa, pluri-sintomática, de evolução crônica, que compromete os órgãos linfopoiéticos e está associada ao desenvolvimento de linfocitose persistente (LP) e linfossarcoma. Acarreta diminuição na produção, quer por seus efeitos danosos diretos, quer pelos indiretos. No entanto, seu efeito na função e na quantidade das diferentes subpopulações de linfócitos, assim como seu papel no estabelecimento de outras doenças oportunistas, ainda não está claro. O presente estudo avaliou a resposta imunitária de bovinos da raça Holandês Preto e Branco naturalmente infectados pelo vírus da LEB (VLB), após desafio antigênico fornecido por vacinação contra o vírus da febre aftosa. Para tal, foram coletadas amostras sanguíneas antes do desafio e, após o desafio, semanalmente, por sete semanas, de dez vacas soropositivas, sem LP; de dez vacas soropositivas, manifestando LP; e de dez vacas soronegativas. Foram avaliadas as alterações quantitativas das diferentes subpopulações de leucócitos circulantes; a função dos linfócitos B, por meio da quantificação de diferentes isotipos de imunoglobulinas (Ig) séricas; os índices de proliferação linfocitária; os índices de morte celular por apoptose ou por necrose; e as concentrações séricas de interleucina-10 (IL-10), IL-12, interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Foi verificada a normalidade da distribuição dos resultados obtidos, utilizando-se do teste de Anderson-Darling, e sua homoscedasticidade, utilizando-se do teste F (para dados que apresentaram distribuição normal) ou do teste de Lavene (para dados que não apresentaram distribuição normal). Para a avaliação das diferenças entre as médias dos resultados obtidos, de acordo, respectivamente, com a ocorrência ou não de homoscedasticidade, foram feitos, para dados com distribuição normal, os testes de análise de variância (One-way ANOVA), seguida do teste de Tukey-Kramer ou o teste t; e, para dados que não apresentaram distribuição normal, o teste de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis. Para todos os resultados, foram consideradas significantes as análises que apresentaram $p \leq 0,05$. Verificou-se que não houve diferença nas concentrações séricas de IgG1, de IgM e de IgA, tanto entre os tempos de coleta, quanto, a cada tempo, entre animais pertencentes aos diferentes grupos. As concentrações séricas de IgG2 aumentaram, após a vacinação, em todos os animais ($p < 0,05$).

Todavia, 17 dias após o desafio antigênico, as concentrações séricas de IgG2, em animais manifestando LP foram, a cada tempo de coleta, menores ($p < 0,01$) que aquelas verificadas nos animais pertencentes aos demais grupos, indicando que animais com LP apresentam resposta humoral menos intensa e menos duradoura. Observou-se que ocorreu um aumento no índice de proliferação de linfócitos sanguíneos ($p < 0,01$), 24 dias após a vacinação contra o vírus da febre aftosa, independente da presença de infecção pelo VLB. A partir deste momento, ocorre um aumento na porcentagem de linfócitos $\gamma\delta$ circulantes ($p < 0,05$) e posterior diminuição nas concentrações séricas de IgG2 ($p < 0,05$), indicando regulação desta resposta humoral por linfócitos $\gamma\delta$. Em bovinos com LP, o aumento na porcentagem de linfócitos $\gamma\delta$ circulantes foi maior ($p < 0,05$), ocasionando diminuição mais intensa e mais precoce nas concentrações séricas de IgG2. Constatou-se que a LP ocorre em decorrência de menor índice de apoptose, posto que as porcentagens de leucócitos sofrendo processo de apoptose foram menores ($p \leq 0,001$) entre as células obtidas de animais manifestando LP, do aquelas coletadas dos animais pertencentes aos demais grupos. Verificou-se que as concentrações séricas das citocinas de perfil Th1, IL-12 e IFN- γ , são maiores em amostras sanguíneas de animais infectados pelo VLB, alinfocitóticos ($p < 0,01$), ao passo que as concentrações séricas das citocinas de perfil Th2, IL-10 e TNF- α , são maiores em amostras sanguíneas de animais infectados manifestando LP ($p < 0,01$), indicando que alterações no perfil sérico de citocinas podem ser causa ou consequência da LP. Em resposta ao desafio vacinal, ocorre uma elevação nas concentrações séricas de IL-10 ($p < 0,01$), de TNF- α ($p = 0,005$) e de IFN- γ ($p < 0,01$), três dias após o desafio, e de IL-12 ($p < 0,001$), dez dias após o desafio. A elevação na concentração sérica de IL-10 perdura até 31 dias após o desafio e pode ser responsável pelo maior índice de proliferação de linfócitos $\gamma\delta$ verificado a partir de 31 dias após a vacinação. Foi observado que a maioria dos linfócitos B circulantes, em bovinos, consiste de linfócitos B1 e, em animais infectados pelo VLB, a LP ocorre em decorrência de um aumento na porcentagem de linfócitos B1a ($p < 0,05$). Além disso, em animais infectados pelo VLB, apresentando LP, as relações entre linfócitos T auxiliares e citotóxicos são menores ($p < 0,01$) e a porcentagem de linfócitos $\gamma\delta$ é maior ($p < 0,01$), indicando atividade viral nas células infectadas. Assim, os resultados permitem-nos concluir que animais infectados pelo VLB, manifestando LP, apresentam alterações na resposta imunitária frente vacinação contra o vírus da febre aftosa.

Palavras-chave: Bovinos. Leucose enzoótica bovina. Resposta imunológica. Vacinação. Febre aftosa.

ABSTRACT

AZEDO, M. R. **Influence of enzootic bovine leukosis on immune response of naturally infected cattle.** [Influência do vírus da leucose bovina na resposta imunitária de animais naturalmente infectados]. 2010. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Enzootic Bovine Leukosis (EBL) is an infectious, multi-symptomatic, chronic, neoplastic disease, which undermines the lymphopoietic organs and is associated with the development of persistent lymphocytosis (PL) and lymphosarcoma. Infected animals present a decrease of production, either by its direct or its indirect harmful effects. However, its effect on the function and quantity of different lymphocyte subpopulations, as well as its role in the establishment of other opportunistic diseases, are unclear. This study evaluated the immune response of Holstein dairy cattle naturally infected with Bovine Leukosis Virus BLV, after antigen challenge provided by vaccination against foot and mouth disease (FMD) virus. To this end, blood samples were collected before challenge and after challenge, weekly, for seven weeks, from ten seropositive cows without PL, from ten seropositive cows expressing PL, and from ten seronegative cows. We evaluated the quantitative changes of different subpopulations of leukocytes; the function of B lymphocytes, through the quantification of different isotypes of immunoglobulins (Ig) serum concentration; the rate of lymphocyte proliferation; the rate of cell death by apoptosis or necrosis; and the serum concentrations of interleukin-10 (IL-10), IL-12, inteferon- γ (IFN- γ), and tumor necrosis factor- α (TNF- α). It was verified the normality of distribution of the results using the Anderson-Darling test, and their homoscedasticity, using the F test (for data with normal distribution) or the Levene test (for data without normal distribution). For the evaluation of differences between the average results, according respectively to the presence or absence of homoscedasticity, we used, for data with normal distribution, One-way ANOVA test, followed by the Tukey-Kramer test or the t test, and, for data without normal distribution, the Mann-Whitney test or the Kruskal-Wallis test. Results with $p \leq 0.05$ were considered statistically significant. There were no differences related to serum IgG1, IgM, and IgA concentrations, both among sampling time and, every time, among animals belonging to different groups. IgG2 serum concentrations increased after vaccination in all animals ($p < 0.05$). However, in animals expressing PL, each collection time, 17 days after antigen challenge, IgG2 serum concentration was lower ($p < 0.01$) than those observed in animals belonging to other groups, indicating that animals with PL present less intense and less enduring humoral response. It was observed that there

was an increase in the rate of lymphocyte proliferation ($p<0.01$) 24 days after vaccination against FMD virus, irrespective of the presence of infection by BLV. From this moment, there was an increase in the percentage of $\gamma\delta$ -lymphocytes ($p<0.05$) and a subsequent decrease in serum IgG2 ($p<0.05$), indicating regulation of this humoral response by $\gamma\delta$ -lymphocytes. In cattle with PL, the increase in the percentage of $\gamma\delta$ -lymphocytes was higher ($p<0.05$), leading to more intense and earlier decrease in IgG2 serum concentration. It was found that PL is due to a lower rate of apoptosis, since the percentage of leukocytes undergoing apoptosis was lower ($p\leq 0.001$) among cells obtained from animals expressing PL, when compared to those collected from animals from the other groups. It was found that serum concentrations of Th1 cytokines, specifically IL-12 and IFN- γ , were higher in blood samples from non-lymphocytotic infected animals ($p<0.01$), whereas serum concentrations of Th2 cytokines, particularly IL-10 and TNF- α , were higher in blood samples from infected animals expressing LP ($p<0.01$), indicating that changes in serum cytokines profile may be a cause or a consequence of PL. IL-10 ($p<0.01$), TNF- α ($p=0.005$), and IFN- γ ($p<0.01$) serum concentrations increased three days after the challenge, and IL-12 serum concentration increased ($p<0.001$), ten days after the challenge. The increase in IL-10 serum concentration lasts until 31 days after the challenge and may account for the higher rate of $\gamma\delta$ -lymphocyte proliferation found from 31 days after vaccination. It was observed that the majority of circulating B lymphocytes in cattle consists of B1 lymphocytes and that, in BLV-infected animals, PL occurs due to an increase in the percentage of B1a lymphocytes ($p<0.05$). Moreover, in lymphocytotic BLV-infected animals, the rate between helper and cytotoxic T-lymphocytes are smaller ($p<0.01$) and the percentage of $\gamma\delta$ -lymphocytes is greater ($p<0.01$), indicating viral activity in infected cells. Thus, results allow us to conclude that lymphocytotic BLV-infected animals show changes in the immune response after vaccination against FMD virus.

Key words: Cattle. Bovine leukosis. Immune response. Vaccination. Foot and mouth disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representando a partícula viral do Vírus da Leucemia Bovina e seus componentes – São Paulo – 2010.....	29
Figura 2 – Esquema representando a hipótese de Gillet et al. (2007) para a manutenção do estado alinfocitótico em animais infectados pelo Vírus da Leucemia Bovina – São Paulo – 2010.....	36
Figura 3 – Esquema representando hipótese para a manutenção do estado alinfocitótico em animais infectados pelo Vírus da Leucemia Bovina – São Paulo – 2010....	37
Figura 4 – Esquema representando hipótese de Amills et al. (2002) para a manutenção da linfocitose persistente, em animais infectados pelo Vírus da Leucemia Bovina – São Paulo – 2010.....	38
Figura 5 – Esquema representando hipótese de Gillet et al. (2007) para a gênese e manutenção da linfocitose persistente, em animais infectados pelo Vírus da Leucemia Bovina – São Paulo – 2010.....	39
Figura 6 – Esquema representando hipótese de suscetibilidade genética para a gênese e manutenção da linfocitose persistente, em animais infectados pelo Vírus da Leucemia Bovina – São Paulo – 2010.....	40
Figura 7 – Resumo esquemático do delineamento experimental adotado no presente estudo – São Paulo – 2010.....	47
Figura 8 – Resumo esquemático do ensaio de proliferação de linfócitos adotado no presente estudo (separação de células mononucleares por gradiente de concentração, lise de eritrócitos e quantificação de células viáveis) – São Paulo – 2010.....	53
Figura 9 – Resumo esquemático do ensaio de proliferação de linfócitos adotado no presente estudo (incorporação de CFSE, incubação para proliferação celular e leitura em citômetro de fluxo) – São Paulo – 2010.....	54
Figura 10 – Resumo esquemático do ensaio de avaliação da morte de leucócitos adotado no presente estudo – São Paulo – 2010.....	56
Figura 11 – Resumo esquemático do ensaio de quantificação de subpopulações de leucócitos do sangue periférico (fenotipagem) adotado no presente estudo – São Paulo – 2010.....	59
Figura 12 – Resultado da imunodifusão em agar gel (IDAG) para diagnóstico de leucose enzoótica bovina em 274 vacas da raça Holandês Preto e Branco – São Paulo – 2010.....	61
Figura 13 – Resultado do teste ELISA para diagnóstico de leucose enzoótica bovina em 274 vacas da raça Holandês Preto e Branco – São Paulo – 2010.....	62
Figura 14 – Distribuição (% sobre total) de 274 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função dos resultados da imunodifusão em gel de agar para diagnóstico de Leucose Enzoótica Bovina e do leucograma – São Paulo – 2010.....	63

Figura 15 – Valores médios da contagem de eritrócitos (por μL de sangue) de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	66
Figura 16 – Valores médios da contagem total de leucócitos (por μL de sangue) de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	67
Figura 17 – Valores absolutos médios da contagem diferencial de linfócitos (por μL de sangue) de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	68
Figura 18 – Valores médios das relações entre os valores absolutos de linfócitos e os valores absolutos de neutrófilos verificados nos leucogramas de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	69
Figura 19 – Valores séricos de cada classe de imunoglobulina verificados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010;;,..	72
Figura 20 – Valores séricos de IgG2 verificados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	73
Figura 21 – Valores séricos de IgG1 verificados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	74
Figura 22 – Valores séricos de IgM verificados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	75
Figura 23 – Valores séricos de IgA verificados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	76
Figura 24 – Índices médios de proliferação de linfócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do estímulo <i>in vitro</i> , a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	80
Figura 25 – Índices médios de proliferação de linfócitos obtidos de 10 vacas da raça Holandês Preto e Branco soronegativas para a Leucose Enzoótica Bovina (grupo SN), em função do estímulo <i>in vitro</i> , a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	81
Figura 26 – Índices médios de proliferação de linfócitos obtidos de 10 vacas da raça Holandês Preto e Branco positivas para a Leucose Enzoótica Bovina, não manifestando linfocitose persistente (grupo AL), em função do estímulo <i>in vitro</i> , a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	82
Figura 27 – Índices médios de proliferação de linfócitos obtidos de 10 vacas da raça Holandês Preto e Branco positivas para a Leucose Enzoótica Bovina, manifestando linfocitose persistente (grupo LP), em função do estímulo <i>in vitro</i> , a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	83

Figura 28 – Índices basais de proliferação de linfócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	84
Figura 29 – Índices de proliferação, após estímulo <i>in vitro</i> com concanavalina-A, de linfócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	85
Figura 30 – Índices de proliferação, após estímulo <i>in vitro</i> com lipopolissacarídeos de <i>Escherichia coli</i> (LPS), de linfócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	86
Figura 31 – Porcentagens médias células em processo de apoptose e de necrose verificadas em leucócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	90
Figura 32 – Porcentagens médias células em processo de apoptose verificadas em leucócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	91
Figura 33 – Concentrações séricas de Interleucina-10 (IL-10), IL-12, Interferon- γ (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) verificados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	95
Figura 34 – Concentrações séricas de Interferon- γ (IFN- γ) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	96
Figura 35 – Concentrações séricas de Interleucina-12 (IL-12) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	97
Figura 36 – Concentrações séricas de Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	98
Figura 37 – Concentrações séricas de Interleucina-10 (IL-10) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	99
Figura 38 – Porcentagens médias de leucócitos CD3(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	103
Figura 39 – Porcentagens médias de leucócitos CD21(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	104
Figura 40 – Porcentagens médias de leucócitos CD2(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	105
Figura 41 – Porcentagens médias de leucócitos WC1(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	106

Figura 42 – Porcentagens médias de leucócitos CD14(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	107
Figura 43 – Porcentagens médias de leucócitos CD3(+) CD4(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	110
Figura 44 – Porcentagens médias de leucócitos CD3(+) CD8(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	111
Figura 45 – Relações médias entre leucócitos CD3(+) CD4(+) e CD3(+) CD8(+), obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	112
Figura 46 – Porcentagens médias de linfócitos B1a (leucócitos CD21+ CD5+ CD11b+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	117
Figura 47 – Porcentagens médias de linfócitos B1b (leucócitos CD21+ CD5- CD11b+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	118
Figura 48 – Porcentagens médias de linfócitos B2 (leucócitos CD21+ CD5- CD11b-) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimenta, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	119
Figura 49 – Porcentagens médias de leucócitos CD21(+) CD5(+) CD11b(-) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	120
Figura 50 – Dinâmica das variáveis estudadas, em amostras sanguíneas obtidas de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	121
Figura 51 – Dinâmica das variáveis estudadas, em amostras sanguíneas obtidas de 10 vacas da raça Holandês Preto e Branco, soronegativas para Leucose Enzoótica Bovina, em função do tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	122
Figura 52 – Dinâmica das variáveis estudadas, em amostras sanguíneas obtidas de 10 vacas da raça Holandês Preto e Branco, soropositivas para Leucose Enzoótica Bovina, sem linfocitose persistente, em função do tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	123
Figura 53 – Dinâmica das variáveis estudadas, em amostras sanguíneas obtidas de 10 vacas da raça Holandês Preto e Branco, soropositivas para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente, em função do tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores do leucograma de fêmeas bovinas sadias, estratificadas segundo a idade, criadas no Estado de São Paulo, utilizados como referência no presente trabalho – São Paulo – 2010.....	49
Tabela 2 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) do hemograma, em números absolutos, de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	64
Tabela 3 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) do hemograma, em números absolutos, de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	65
Tabela 4 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) das quantidades de imunoglobulinas séricas (mg/dL) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	70
Tabela 5 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) das quantidades de imunoglobulinas séricas (mg/dL) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	71
Tabela 6 – Índices médios ($\pm$ desvio padrão) de proliferação de linfócitos, com e sem estímulo <i>in vitro</i> , observados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	77
Tabela 7 – Índices médios ($\pm$ desvio padrão) de proliferação de linfócitos, com e sem estímulo <i>in vitro</i> , observados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	79
Tabela 8 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de leucócitos em processo de apoptose ou em processo de necrose, observadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	87
Tabela 9 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de leucócitos em processo de apoptose ou em processo de necrose, observadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	88
Tabela 10 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) das quantidades de IL-12, IFN- γ , IL-10 e TNF- α séricas (pg/mL) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	92
Tabela 11 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) das quantidades de IL-12, IFN- γ , IL-10 e TNF- α séricas (pg/mL) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	93
Tabela 12 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de leucócitos CD3(+), CD21(+), WC1(+), CD2(+) e CD14(+), observadas no sangue periférico de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	100

Tabela 13 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de leucócitos CD3(+), CD21(+), WC1(+), CD2(+) e CD14(+), observadas no sangue periférico em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	101
Tabela 14 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de linfócitos CD3(+) CD4(+) e CD3(+) CD8(+) e relações entre linfócitos CD3(+) CD4(+) e CD3(+) CD8(+), verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	108
Tabela 15 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de linfócitos CD3(+) CD4(+) e CD3(+) CD8(+) e relações entre linfócitos CD3(+) CD4(+) e CD3(+) CD8(+), verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	109
Tabela 16 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) das subpopulações de linfócitos B (CD21 ⁺), verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	113
Tabela 17 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) das subpopulações de linfócitos B (CD21 ⁺) no sangue periférico de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta – São Paulo – 2010.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (do inglês: <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
APC	Célula Apresentadora de Antígeno (do inglês: <i>Antigen-presenting Cell</i>)
ATL	Leucemia aguda de células T (do inglês: <i>Acute T-Cell Leukemia</i>)
BoLA	Antígeno leucocitário bovino (do inglês: <i>Bovine Leukocyte Antigen</i>)
CD	Grupamento de Diferenciação (do inglês: <i>Cluster of Differentiation</i> ou <i>Cluster of Designation</i>)
CFSE	Éster de succinimidil diacetato de carboxifluoresceína (do inglês: <i>Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester</i>)
Con-A	Concanavalina-A
COX	Cicloxygenase
Cy-5	Cianina-5 (do inglês: <i>Cyanine-5</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (do inglês: <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
gp51	Glicoproteína 51
HAM/TSP	Mielopatia/paraparesia espástica tropical associadas ao HTLV (do inglês: <i>HTLV-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência de humanos (do inglês: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HTLV	Vírus linfotrópicos de células T de humanos (do inglês: <i>Human T-lymphotropic Virus</i>)
IDAG	Imunodifusão em agar gel
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INF	Interferon
LEB	Leucose enzoótica bovina
LP	Linfocitose persistente
LPS	Lipopolissacarídeos

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II (do inglês: <i>Major Histocompatibility Complex – Class II</i>)
mRNA	RNA mensageiro
OIE	Escritório Internacional de Epizootias (do francês <i>Office International des Epizooties</i>), atual Organização Mundial para Saúde Animal
OLA	Antígeno leucocitário ovino (do inglês: <i>Ovine Leukocyte Antigen</i>)
p24	Proteína 24
p40	Proteína 40
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico (do inglês: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	Solução salina fosfatada (do inglês: <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Ficoeritrina (do inglês: <i>Phycoerytrin</i>)
PHEFA	Plano Hemisférico de Erradicação da Febre Aftosa
PI	Iodeto de Propídio (do inglês: <i>Propide Iodide</i>)
PNEFA	Programa Nacional de Erradicação da Febre Aftosa
PTLV	Vírus linfotrópicos de células T de primatas (do inglês: <i>Primate T-lymphotropic Vírus</i>)
RNA	Ácido ribonucléico (do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>)
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i> (do inglês: <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>)
sIgM	Imunoglobulina M de superfície
STLV	Vírus linfotrópicos de células T de símios (do inglês: <i>Simian T-lymphotropic Vírus</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês: <i>Tumor necrosis factor</i>)
VLB	Vírus da leucose bovina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1	ANIMAIS EMPREGADOS.....	47
4.2	COLETAS DE SANGUE.....	48
4.3	ANÁLISE HEMATOLÓGICA.....	49
4.4	SORODIAGNÓSTICO.....	49
4.5	DESAFIO ANTIGÊNICO.....	50
4.6	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL.....	50
4.7	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR.....	51
4.7.1	Avaliação da Proliferação de Linfócitos	51
4.7.2	Avaliação da Morte Celular	55
4.8	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS.....	57
4.9	QUANTIFICAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS.....	57
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5	RESULTADOS	61
5.1	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL.....	69
5.2	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS.....	76
5.3	AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR.....	86
5.4	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS.....	91
5.5	QUANTIFICAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS.....	99
5.5.1	Quantificação das subpopulações de linfócitos T	107
5.5.2	Quantificação das subpopulações de linfócitos B	112
5.6	AVALIAÇÃO GLOBAL DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	120
6	DISCUSSÃO	125
6.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	125
6.2	AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL.....	126
6.3	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS.....	130

6.4	AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR.....	133
6.5	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS.....	135
6.6	QUANTIFICAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS.....	138
6.7	AVALIAÇÃO GLOBAL DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	142
7	CONCLUSÃO	145
	REFERÊNCIAS	147

1 INTRODUÇÃO

A busca por uma maior produtividade deve ser o objetivo primordial de programas utilizados na criação de bovinos. Para tal, tornam-se imprescindíveis um preciso manejo alimentar e um criterioso manejo reprodutivo, aliados a não menos importante provisão de condições que assegurem o adequado bem-estar animal.

Nada obstante, a permanente conservação de apropriadas condições sanitárias contribui sobremaneira para uma maior eficiência produtiva. Neste contexto, diversas doenças são consideradas fundamentais em decorrência da possibilidade de morte do animal ou de comprovadas perdas econômicas. Todavia, a presença de enfermidades que possam, de modo crônico, alterar, ou mesmo restringir, os mecanismos relacionados com a defesa do organismo frente à instalação e ao desenvolvimento de novas afecções, deve ser considerada na condução de programas voltados para um perfeito estado de saúde animal.

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma enfermidade crônica que, particularmente, compromete o tecido linfóide destes animais. De caráter infeccioso e plurissintomático, alguns animais acometidos podem apresentar neoplasias, enquanto, em outros, a afecção ocasiona um aumento persistente na contagem absoluta de linfócitos circulantes, denominado de linfocitose persistente (LP). Causada pelo vírus da leucose bovina (VLB), acarreta menor produção em consequência dos efeitos diretos e indiretos decorrentes da formação tumoral. Contudo, o envolvimento da infecção na função e na quantidade das diferentes subpopulações leucocitárias, assim como seu papel no estabelecimento de outras doenças oportunistas, ainda não está devidamente esclarecido.

Além disso, um efeito imunossupressivo nestes animais pode interferir na qualidade da resposta a antígenos vacinais, mantendo-os em condições inadequadas frente às possíveis infecções, e no resultado de exames laboratoriais que necessitem apropriado desempenho do sistema imunitário, contribuindo para a perpetuação de enfermidades no rebanho com a presença não diagnosticada de portadores disseminando agentes infecciosos a animais sadios.

Por ser um deltaretrovírus relacionado aos vírus linfotrópicos de células T de humanos, boa parte dos estudos relacionados ao VLB busca elucidar os mecanismos patogênicos envolvidos nesta enfermidade, bem como fornecer informações acerca das interações entre os demais deltaretrovírus e seus hospedeiros. Para tal, mormente utiliza-se da infecção experimental em ovinos, considerada modelo experimental. No entanto, alguns resultados verificados parecem ser diversos daqueles porventura observados na infecção natural em

bovinos.

Deste modo, este estudo baseou-se na hipótese de que o VLB, além de promover alterações neoplásicas deletérias, altera qualitativa e quantitativamente a resposta imunitária de bovinos naturalmente infectados de modo diverso daquele relatado em ovinos experimentalmente infectados. Para tanto, foram avaliados aspectos desta resposta, frente ao desafio com antígeno fornecido por vacinação contra o vírus da febre aftosa, em bovinos naturalmente infectados com e sem LP, comparando-se com aqueles verificados em animais sem a infecção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB), caracterizada como uma enfermidade neoplásica infecciosa, plurissintomática e de evolução crônica, afeta, particularmente, a linhagem celular linfóide destes animais (SCHWARTZ; LEVY, 1994).

Seu agente etiológico, o Vírus da Leucemia Bovina (VLB) encontra-se, atualmente, assim como os vírus linfotrópicos de células T de primatas (PTLV: de humanos – HTLV tipos 1, 2, 3 e 4; e de símios – STLV tipos 1, 2, 3 e 6), classificado no gênero *Deltaretrovirus*, da subfamília *Orthoretrovirinae* da família *Retroviridae* (FAUQUET et al., 2004). Sensíveis à ação de solventes, detergentes, ao congelamento e ao calor, mas relativamente resistentes à luz ultravioleta (DONOVAN, 2003; SHIMIZU et al., 2004), os retrovírus são vírus esféricos contidos em envelope glicoprotéico (figura 1), com 80 a 100 nm de diâmetro. Seus capsídeos icosaédricos envolvem um nucleocapsídeo helicoidal, que contém duas fitas de ácido ribonucleico (RNA) lineares, simples e de sentido positivo, além de proteínas centrais, incluindo as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase (QUINN et al., 2005).

Figura 1 – Esquema representando a partícula viral do Vírus da Leucemia Bovina e seus componentes – São Paulo – 2010

Tais características conferem aos retrovírus pormenores que determinam patogenia

peculiar em seus diferentes hospedeiros.

Dentre os Deltaretrovírus, mais especificamente a infecção pelo HTLV-1 em humanos é endêmica e atinge entre 10 e 20 milhões de indivíduos, parte dos quais (cerca de 2 a 3%) desenvolve leucemia aguda de células T (ATL) ou mielopatia/paraparesia espástica tropical associadas ao HTLV (HAM/TSP), uma enfermidade inflamatória do sistema nervoso central (EDLICH; ARNETTE; WILLIAMS, 2000; SHUH; BEILKE, 2005). Além disso, uma simultânea infecção com o Vírus da Imunodeficiência de Humanos (HIV), pandêmica (SAWIRES et al., 2009) parece acelerar, segundo Karpas (2004), a progressão para a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

O VLB compartilha arranjo estrutural e genético com os HTLV (SAGATA; IKAWA, 1984), que são associados à leucemia e, também, ao surgimento de linfoma em humanos adultos (SHUH; BEILKE, 2005). Desta forma, aventa-se a possibilidade de que ambos desenvolvam doença crônica e proliferação das células-alvo envolvendo células e mediadores imunológicos (JOHNSON; HARROD; FRANCHINI, 2001; OHSHIMA, 2007).

Além disso, apesar de não ter sido encontrado o ácido desoxirribonucléico (DNA) proviral do VLB em humanos com leucemia e com câncer de pulmão que consumiam carne bovina oriunda de regiões endêmicas para a LEB (LEE et al., 2005), Buehring, Philpott e Choi (2003) haviam, anteriormente, encontrado anticorpos reativos com o VLB em 74% de 257 amostras de soro humano, sugerindo exposição humana ao vírus através da alimentação e fomentando pesquisas acerca da enfermidade.

Por estas razões, o VLB tem sido sugerido como modelo animal para o estudo da influência dos vírus oncogênicos linfotrópicos na resposta imunológica do hospedeiro (HEIN; GRIEBEL, 2003), principalmente, por meio de infecção experimental em ovinos (DEBACQ et al., 2006; BOUZAR et al., 2009; FLORINS et al., 2009).

Tal modelo é preferido em decorrência da facilidade de manejo e pelo fato de que a enfermidade, nesta espécie, provoca alterações mais precoces e mais frequentes (WILLEMS et al., 1993), quando comparadas às que ocorrem em bovinos infectados. Não obstante, alguns pesquisadores estudam bovinos natural ou experimentalmente infectados (UNGAR-WARON et al., 1999; AZEDO et al., 2008; JULIARENA et al., 2009).

Pesquisas envolvendo ovinos infectados auxiliam no esclarecimento da patogenia retroviral, no entanto, alguns resultados verificados podem ser diversos daqueles porventura observados na infecção natural em bovinos (FLORINS et al., 2008).

A LEB está, atualmente, quase completamente erradicada da União Européia (GILLET et al., 2007), mas sua prevalência é alta em outras regiões do mundo. No Brasil, sua

ocorrência foi relatada em quase todos os Estados (D'ANGELINO; GARCIA; BIRGEL, 1998a; SIMÕES, 1998; MELO, 1999; CARNEIRO, 2000; BIRGEL JÚNIOR, 2001; SILVA, 2001; MATOS; BIRGEL JÚNIOR; BIRGEL, 2005; CAMARGOS et al., 2007), com taxas de ocorrência que variam de 2,1% (MEAS et al., 2002a) a 81,1% (MEIRELLES et al., 2009). No entanto, na média, tais taxas acompanham as observadas em rebanhos de outros países, de cerca de 40%, para rebanhos leiteiros (LORENZ; STRAUB, 1987), e de menos de 5%, para rebanhos voltados para a produção de carne (BAUMGARTENER et al., 1975).

Na pecuária bovina atual, sua transmissão ocorre, principalmente, através de transferência iatrogênica de linfócitos infectados pelo uso indiscriminado de instrumentos (como em descornas, tatuagem de orelhas e no uso de agulhas) sem a devida desinfecção (TIWARI et al., 2009).

Deste modo, é relatada uma maior prevalência em rebanhos de alta produção devido ao fato destes serem submetidos a manipulações mais intensas, apresentando, conseqüentemente, uma maior possibilidade de exposição às formas de disseminação horizontal da enfermidade (SARGEANT et al., 1997).

Salienta-se que, em condições propícias, insetos também foram responsabilizados pela transmissão (FREITAS; ROMERO, 1991; CARN, 1996; MORRIS et al., 1996), suscitando uma maior disseminação, também, em condições de aglomeração de animais suscetíveis e contaminados, com concomitante presença de insetos hematófagos.

O estudo conduzido por Meãs et al. (2002) sugere que, em bovinos, não ocorra transmissão intrauterina. Não obstante, partículas virais foram encontradas no colostro e no leite de fêmeas infectadas (BUEHRING et al., 1994), corroborando com a sugestão de que o vírus pode ser transmitido da mãe para o neonato através da amamentação (NAGY; TYLER; KLEIBOEKER, 2006).

No entanto, a relação entre a infecção pelo VLB em bezerros e a ingestão do colostro não é clara. Supõe-se que a ingestão de colostro transmite o VLB para bezerros neonatos, porém, aventa-se a possibilidade de que os anticorpos colostrais possam ser protetores.

De fato, verificou-se que, após a ingestão de colostro de vacas infectadas, bezerros não infectados tornam-se soropositivos para o VLB (LYSONS, 2010). Por sua vez, Nagy, Tyler e Kleiboeker (2007) haviam concluído que bezerros nascidos de vacas positivas para o VLB são, realmente, expostos durante parto, e, de fato, uma proporção destes bezerros torna-se infectada, todavia, segundo os autores, a administração de colostro de vacas positivas para o VLB diminui sobremaneira o risco de infecção.

Apesar de ter sido possível detectar o DNA proviral em amostras de sêmen de touros

infectados (DUS SANTOS et al., 2007), não foi evidenciado o risco de transmissão aos embriões através de sêmen contaminado, quando observados os protocolos de coleta de sêmen e de produção de embriões aprovados internacionalmente (WRATHALL; SIMMONS; VAN SOOM, 2006).

O VLB infecta, principalmente, linfócitos B (SCHWARTZ et al., 1994), expressando, 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, com algumas flutuações para os últimos três marcadores nos estágios terminais da enfermidade (GILLET et al., 2007). Por sua vez, o HTLV-1 claramente infecta outros tipos celulares: linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (JOHNSON; HARROD; FRANCHINI, 2001; NAGAI et al., 2001), revelando uma diferença principal entre os dois sistemas virais.

Quer em bovinos naturalmente infectados, quer em ovinos experimentalmente infectados, a LEB está associada ao desenvolvimento de linfocitose persistente (LP) e de linfoma (SCHWARTZ; LEVY, 1994). Parodi (1987) observou que, infectado, o animal pode apresentar-se com sorodiagnóstico positivo, sem a presença de LP (animal alinfocitótico ou aleucêmico – termo melhor utilizado quando se referindo à condição encontrada em ovinos infectados) ou com sorodiagnóstico positivo apresentando LP. Nestes, a LP é caracterizada por uma elevação crônica no número de linfócitos circulantes, encontrada, segundo o autor, em cerca de 30 a 70% dos bovinos infectados.

Ainda segundo Parodi (1987), cerca de 0,1 a 10% dos animais infectados podem, por sua vez, desenvolver manifestações tumorais, caracterizadas por infiltração de linfócitos B (YIN et al., 2003) em órgãos ricos em tecido linfóide, comumente os linfonodos, o baço, o coração, o útero, o abomaso, o fígado e/ou os rins (IKEDA et al., 2005), tendo previamente apresentado ou não LP.

Ressalva-se que a LP foi definida, pelo Comitê Internacional sobre Leucose Bovina, em 1968, como um aumento na contagem absoluta de linfócitos de três ou mais desvios-padrão acima dos valores médios de referência, determinados para a raça e grupo etário de animais em rebanhos livres de leucose (MARSHAK; ABT, 1968). Ainda segundo o Comitê, o conceito de LP deve ser aplicado a um aumento no número de linfócitos circulantes que persiste por mais de três meses.

Outrossim, segundo Parodi (1987), deve-se distinguir LP, um aumento persistente da contagem linfocitária normal no sangue de alguns animais infectados com o VLB e que não tem manifestações clínicas ou lesões detectáveis, de leucemia, que corresponde à presença de

células tumorais detectáveis na corrente sanguínea. Para o autor, à época, não existiam evidências para se considerar a LP quer como uma condição linfoproliferativa benigna associada à infecção pelo VLB, quer como uma condição neoplásica.

Atualmente constata-se que, de fato, bovinos manifestando LP não apresentam linfócitos com características neoplásicas em sua circulação. No entanto, estudos ainda são realizados visando elucidar a condição linfoproliferativa como gênese da LP.

Os sintomas relatados, decorrentes da infecção, advêm do desenvolvimento do linfoma. Tornam-se evidentes quando os tumores invadem os diferentes tecidos e são dependentes do órgão envolvido, podendo abranger aumento do volume de linfonodos, inapetência, perda de peso e diminuição na produção (PARODI, 1987). Em decorrência das formações tumorais, também são relatados, abortamento, partos laboriosos, paresias ou paralisias e exoftalmia (BURNY et al., 1988).

Deste modo, perdas econômicas diretas decorrentes da LEB são evidenciadas, principalmente, em rebanhos que contenham animais apresentando manifestações tumorais e são devidas à redução da produção de leite e do ganho de peso, à invariável condenação das carcaças, aos custos precoces com a reposição e a um possível aumento dos custos com serviços veterinários (D'ANGELINO; GARCIA; BIRGEL, 1998b; CHI et al., 2002; TIWARI et al., 2007). Perdas indiretas são decorrentes da restrição no comércio de animais ou de seus produtos (BIRGEL et al., 1983; THURMOND, 1987; PELZER, 1997).

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, bem como da idade, do sexo e das condições gerais de saúde do animal (RITTER, 1965).

Assim, pesquisas foram realizadas com o intuito de se estabelecer o comportamento hematológico em animais infectados e, assim, uma “chave leucométrica” para o diagnóstico da LEB (CHEVRIER; GAYOT, 1966; GEHRKE et al., 1971; LALOV, 1971; LORENZ; STRAUB, 1976). Contudo, sabe-se que as alterações leucocitárias ocorrem em cerca de 30 a 70% dos animais infectados, incorrendo na obtenção de um grande número de resultados falso negativos, e que tais alterações também ocorrem em outras situações, inclusive na higidez, obtendo-se muitos resultados falso positivos (NAGY et al., 2002; KALE; YAVRU; YAPKIC, 2005).

Ressalta-se que, morfológicamente, linfócitos atípicos podem ser encontrados em

leucogramas de animais apresentando LP, contudo, tais células podem, ocasionalmente, ser observadas em amostras obtidas de animais saudáveis ou de animais portadores de infecções diversas da LEB (COCKERELL; REYES, 2000).

Atualmente, a LEB pode ser diagnosticada por métodos sorológicos, como imunodifusão em agar gel (IDAG) ou ensaio de imunoabsorção por ligação enzimática (ELISA), para o sorodiagnóstico em provas preconizadas pela Organização Mundial para Saúde Animal (anteriormente denominada “Office International des Epizooties” – OIE). Ainda, a enfermidade também pode ser diagnosticada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para a detecção direta do genoma viral ou de seu provírus (BIRGEL, 1982; MONKE et al., 1992; NAGY et al., 2003; TEIFKE; VAHLENKAMP, 2008; JULIARENA et al., 2009).

Apesar de diversos estudos *in vitro* e *in vivo*, pautados na atividade antirretroviral de determinadas substâncias, ou mesmo no controle do desenvolvimento tumoral (ACHACHI et al., 2005; INSINGA et al., 2005; FERENS et al., 2007; LEZIN et al., 2009), não há, até o momento, possibilidade de tratamento para animais infectados pelo VLB.

Não obstante, a maior parte dos animais com LEB permanece assintomática, alinfocitótica ou manifestando LP, atuando como reservatório e disseminando o vírus. Assim, esforços devem ser concentrados no controle da infecção (YOSHIKAWA et al., 1992; CORDEIRO et al., 1994; MOLLOY et al., 1994; DEREN; SZEWCZYK-SADOWSKA; RULKA, 2003).

Posto que a utilização de vacinas para o controle da LEB ainda não apresenta resultados consistentes (MATEO; GARDNER; SUHRBIER, 2001; USUI et al., 2003; ALTANEROVA et al., 2004), entende-se que a detecção e a identificação dos bovinos sororreagentes positivos aos antígenos do VLB e sua retirada dos rebanhos ainda seja o princípio fundamental para se evitar a disseminação da enfermidade (MOLLOY et al., 1994).

Apesar de todos os conhecimentos adquiridos ao longo de décadas de estudo, a patogenia exata da infecção causada pelos deltaretrovírus ainda não foi completamente elucidada. Embora as principais células infectadas pelo HTLV sejam os linfócitos T (JOHNSON; HARROD; FRANCHINI, 2001), enquanto aquelas primordialmente infectadas pelo VLB sejam os linfócitos B, supõe-se que a patogenia envolva mecanismos imunomoduladores semelhantes em ambas infecções (KABEYA; OHASHI; ONUMA, 2001).

Não foi observada viremia após a infecção pelo VLB (KLINTEVALL; FUXLER; FOSSUM, 1997), mas, mesmo com a detecção de quantidades significativas e duradouras de anticorpos neutralizantes séricos dirigidos contra antígenos do núcleo (p 24) e do envelope

(gp 51) virais (CUNHA; TEIXEIRA; DE SOUZA, 1982), o vírus não é eliminado do organismo, protegendo-se no interior das células infectadas e sugerindo alguma influência na imunidade celular do hospedeiro para a manutenção (ou mesmo para a evolução) da enfermidade (SCHWARTZ; LEVY, 1994).

Realmente, na manifestação alinfocitótica da LEB, supõe-se que a persistência viral ocorra através do controle da expressão de antígenos virais nas células infectadas, posto que há a eliminação de células que os expressam, por meio, fundamentalmente, da resposta imunitária mediada por células.

Corroborando com tal teoria, Juliarena, Gutierrez e Ceriani (2007) verificaram que existem bovinos infectados alinfocitóticos com alta carga proviral (indicando maior expressão viral) e forte resposta imunitária (evidenciada por altos títulos de anticorpos contra antígenos virais) e bovinos infectados alinfocitóticos com baixa carga proviral (indicando menor expressão viral) e resposta humoral menos intensa.

Ainda, Beyer et al. (2002) encontraram linfopenia, com específica redução na quantidade de linfócitos B, em bovinos infectados pelo VLB, com tal forma de apresentação da enfermidade, quando comparados com animais soronegativos e com animais infectados apresentando linfocitose.

Tal eliminação pode estar associada à atuação de linfócitos- $\gamma\delta$, induzidos pela ação do interferon- γ (INF- γ). Murakami et al. (2004), após inoculação intraperitoneal de INF- γ , observaram um aumento na quantidade de linfócitos- $\gamma\delta$ circulantes, uma diminuição do número de linfócitos apresentando sIgM⁺ e uma supressão da replicação viral *in vitro* em células de bovinos infectados. Já Lundberg e Splitter (2000) haviam concluído que, em bovinos, linfócitos- $\gamma\delta$ reconhecem o antígeno do VLB expressado em células infectadas, sem a necessidade de interações clássicas com o MHC, apenas em animais infectados alinfocitóticos.

Por sua vez, Pyeon e Splitter (1998) encontraram uma maior expressão do RNA mensageiro (mRNA) que codifica a interleucina-12 (IL-12) em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) dos bovinos infectados sem linfocitose do que naqueles que apresentavam linfocitose, sugerindo seu envolvimento na regulação do INF- γ . Keefe et al. (1997) já haviam demonstrado elevados níveis de expressão dos mRNA codificando tanto a IL-12 quanto o INF- γ em bovinos que apresentavam esta forma de apresentação da infecção.

Desta forma, a hipótese atualmente ventilada para a manutenção de um estado alinfocitótico, na infecção pelo VLB (GILLET et al., 2007), baseia-se em uma constante expressão de antígenos virais na superfície de linfócitos B infectados, que são constantemente

B: linfócito B infectado; **Lyδ:** linfócito $\gamma\delta$.

Figura 3 – Esquema representando hipótese para a manutenção do estado alinfocítico em animais infectados pelo Vírus da Leucemia Bovina, quando, supõe-se, há um balanço entre a produção de novas partículas virais, sua neutralização por anticorpos séricos, a infecção de novos linfócitos B e a eliminação de células que expressam antígenos virais, principalmente pela ação de linfócitos $\gamma\delta$ – São Paulo – 2010

Não está suficientemente claro se tais alterações são devidas à interação direta entre o vírus e a célula-alvo ou se elas são parcial ou totalmente induzidas por substâncias imunomoduladoras, como as citocinas, e, deste modo, determinadas pelo hospedeiro.

Sabe-se que o provírus integra-se ao material genético dos linfócitos B e supõe-se que seu potencial infectivo (e a progressão da infecção) esteja ligado à multiplicação destas células (FULTON; PORTELLA; RADKE, 2006). Por outro lado, os vírus desenvolveram estratégias para neutralizar a resposta apoptótica das células do hospedeiro e acredita-se que a modulação da apoptose, associada ou não a um aumento na taxa da proliferação celular, possa ser um componente fundamental na persistência viral e na progressão para a linfocitose induzida pelos retrovírus (DEBACQ et al., 2002).

Neste contexto, Konnai et al. (2006) demonstraram que as PBMCs de bovinos infectados apresentam proliferação espontânea *in vitro* dependente de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e que estas expressam maior quantidade de mRNA do TNF- α do que aquelas sem proliferação espontânea coletadas de animais não infectados pelo VLB. Previamente, os autores haviam demonstrado que esta proliferação é maior nas células de bovinos apresentando LP do que naquelas dos alinfocitóticos ou dos soronegativos e que elas expressavam maiores níveis de mRNA do receptor II do TNF- α , que induz resposta celular proliferativa (KONNAI et al., 2005).

Por sua vez, Debacq et al. (2003) haviam verificado que a taxa de morte celular de

linfócitos B de bovinos com LP era reduzida em relação à dos animais alinfocitóticos, e que a proliferação destas células também se encontrava reduzida, porém em menor grau. No entanto, quando avaliando ovinos experimentalmente infectados, os mesmos pesquisadores concluíram que, nesta espécie, a LP resulta de um maior índice de proliferação celular, não havendo diferença na taxa de apoptose quando comparada com aquela de animais infectados sem LP (DEBACQ et al., 2002).

Amills et al. (2002) encontraram uma menor expressão do mRNA codificando IFN- α , IL-2 e IL-4 em PBMCs de bovinos com LP do que nas de animais alinfocitóticos, bem como Yakobson et al. (2000), além de Pyeon, O'Reilly e Splitter (1996), haviam previamente observado que, em bovinos com esta forma de apresentação da infecção, ocorre um aumento na expressão do mRNA que codifica a IL-10 nestas células, sugerindo que a alteração de resposta imune celular (Th-1) para humoral (Th-2) possa estar envolvida com a progressão da enfermidade (Figura 4).

B: linfócito B infectado; **Macr:** macrófago; **CD4:** Linfócito T auxiliar; **Lyδ:** linfócito $\gamma\delta$; **IL-2:** interleucina-2; **IL-10:** interleucina-10; **TNF- α :** Fator de Necrose Tumoral- α ; **TNF-R:** receptor para TNF.

Figura 4 – Esquema representando hipótese de Amills et al. (2002) para a manutenção da linfocitose persistente, em animais infectados pelo Vírus da Leucemia Bovina: da interação entre a célula infectada, células apresentadoras de antígenos e linfócitos T auxiliares ocorre um perfil de citocinas Th2, que, por ação do TNF- α em receptores do tipo II, expressos nas células infectadas, promove sua proliferação – São Paulo – 2010

Por outro lado, Gillet et al. (2007) postulam que a LP seja decorrente do acúmulo dos linfócitos infectados em que inexiste expressão viral e que, por conseguinte, não são eliminados pelo sistema imunitário do hospedeiro (Figura 5). Realmente, os autores relatam que, em animais manifestando LP, apenas cerca de um em cada 10.000 linfócitos B

expressam mRNA que codificam proteínas virais.

B: linfócito B infectado; **Lyδ:** linfócito $\gamma\delta$.

Figura 5 – Esquema representando hipótese de Gillet et al. (2007) para a gênese e manutenção da linfocitose persistente, em animais infectados pelo Vírus da Leucemia Bovina: linfócitos B infectados, em que há atividade viral e expressão de antígenos virais são eliminados, no entanto, aqueles em que o vírus apresenta-se inativo não são eliminados e acumulam-se na circulação – São Paulo – 2010

Ainda buscando elucidar a gênese da LP, estudos acerca da relação entre a infecção pelo VLB e o polimorfismo de genes que codificam o MHC bovino (“Bovine Leukocyte Antigen” – BoLA) (LEWIN; BERNOCO, 1986; LEWIN, 1989; XU et al., 1993; ZANOTTI et al., 1996) e ovino (OLA) (KONNAI et al., 2003a; DUKKIPATI et al., 2006) revelam que a presença de diferentes alelos está relacionada à resistência e suscetibilidade genética do hospedeiro ao surgimento da LP (Figura 6).

A principal função de moléculas do MHC é a apresentação de antígenos peptídicos processados no interior das células para linfócitos T e, desta maneira, deflagrar a resposta imunitária adaptativa do hospedeiro contra patógenos específicos (LEWIN; RUSSELL; GLASS, 1999). O grau de polimorfismo nas moléculas de MHC permite a apresentação de um vasto número de antígenos que diferem em tamanho e sequência de peptídeos (JANEWAY et al., 2004). Deste modo, a presença ou a ausência de determinado alelo pode influenciar a apresentação de antígenos do VLB aos linfócitos T e a decorrente eliminação das células infectadas, determinando resistência genética à gênese e, por conseguinte, à ocorrência de LP.

B: linfócito B infectado; **Ly δ :** linfócito $\gamma\delta$.

Figura 6 – Esquema representando hipótese de suscetibilidade genética para a gênese e manutenção da linfocitose persistente, em animais infectados pelo Vírus da Leucemia Bovina: em animais geneticamente resistentes, há a apropriada apresentação de antígenos virais e a eliminação de células que os expressam, principalmente pela ação de linfócitos $\gamma\delta$; já em animais suscetíveis, ocorre uma inadequada apresentação de antígenos virais pelas células infectadas, que não são eliminadas e acumulam na circulação – São Paulo – 2010

Afora os mecanismos que abrangem a patogênese da LEB, o efeito da infecção pelo VLB na função das diferentes populações de leucócitos, assim como um possível papel no desencadeamento de outras doenças oportunistas, também não está claro.

Sugere-se, destarte, que possa haver algum tipo de imunossupressão em animais com LEB, que, associada aos vários fatores de estresse advindos do manejo dos rebanhos bovinos, pode aumentar a suscetibilidade do animal a outras infecções, contribuindo para sua baixa produção (FLAMING et al., 1997). Por outro lado, supõe-se, também, que infecções intercorrentes (e as consequentes respostas do hospedeiro) possam auxiliar na gênese da LP, interferindo na progressão da LEB e/ou colaborando na manutenção do estado de imunossupressão (TRAININ et al., 1996).

Buscando elucidar a questão da suposta imunossupressão, autores passaram a investigar funções inerentes aos linfócitos B, principais células envolvidas na infecção pelo VLB, nomeadamente funções relacionadas à produção de anticorpos.

Heeney, Valli e Montesanti (1988) relataram uma menor produção total de imunoglobulinas séricas em bovinos infectados apresentando linfomas, porém comparando

apenas com aqueles que não apresentavam a forma tumoral, independente dos resultados do leucograma. Por sua vez, Gatei, Lavin e Daniel (1990), investigando bovinos pertencentes a diferentes raças, encontraram uma menor concentração sérica de IgM em animais apresentando LP do que naqueles sem linfocitose e destes em relação a animais com sorodiagnóstico negativo, contudo, as concentrações séricas de IgG1 e IgG2 não diferiram entre os grupos.

Já Teutsch e Lewin (1996) observaram uma expressão alterada no mRNA, relacionado à transcrição de imunoglobulinas, em linfócitos B de vacas infectadas pelo VLB com LP, quando comparada com a expressão verificada em células obtidas de bovinos com contagem linfocitária normal, infectados ou não, o que veio a ser corroborado pelas observações feitas por outros autores que verificaram alterações funcionais em imunoglobulinas de animais infectados (LEVKUT et al., 1995).

No Brasil, Garcia (1992) não observou alterações na produção de anticorpos contra o vírus da febre aftosa entre animais com sorodiagnóstico negativo e positivo sem linfocitose e com linfocitose moderada e acentuada. No entanto, o autor não verificou a ocorrência de LP e, utilizando-se de micro-soroneutralização após o desafio, não aferiu as diferentes classes de imunoglobulinas. Em 2001, Birgel Júnior também observou que as concentrações séricas das imunoglobulinas IgG e IgM dos animais não reagentes ao VLB foram semelhantes às aquelas encontradas nos animais reagentes sem LP e nos que apresentavam LP (BIRGEL JÚNIOR, 2001).

Embora o VLB infecte principalmente linfócitos B, assim como em outras infecções por retrovírus (por exemplo, na infecção pelo HIV e na infecção pelo vírus da imunodeficiência felina), células da série monócito/macrófago apresentam um papel importante como reservatórios virais (ALTREUTHER et al., 2001). Além disso, células desta linhagem possivelmente podem atuar na patogênese de infecções por retrovírus também por sua função como produtores de citocinas, como IL-1 e TNF, podendo, assim, contribuir para a evolução da enfermidade (MEIROM et al., 1997).

Em vista disso, a possibilidade de que outros tipos celulares sejam susceptíveis à infecção pelo VLB vem sendo estudada por alguns autores. Heeney et al. (1992) relataram evidências de que monócitos purificados por aderência continham o provírus em bovinos infectados naturalmente. Por sua vez, Mirsky et al. (1996) também encontraram monócitos infectados, mas, utilizando-se de citometria de fluxo, não puderam afirmar que não se tratava de contaminação por linfócitos B infectados, visto que as porcentagens celulares foram semelhantes.

Domenech et al. (2000), infectando macrófagos bovinos *in vitro*, observaram que, embora apresentando poucas alterações estruturais, tais células expressavam diversas proteínas virais, indicando replicação viral.

Seguindo este ensejo, Werling et al. (1995) demonstraram que a infecção pelo VLB altera a produção e a atividade de citocinas produzidas por monócitos, após estimulação *in vitro* com lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli*. Os autores observaram produção de IL-1 quatro vezes maior no sobrenadante de culturas de monócitos obtidos de vacas infectadas com LP, porém com atividade diminuída em cerca de 30%, quando comparada com o sobrenadante de culturas de monócitos obtidos de vacas soronegativas. Por outro lado, o TNF do sobrenadante de culturas de monócitos obtidos de vacas soropositivas apresentou atividade cerca de cinco vezes maior do que aquele obtido no sobrenadante de culturas de monócitos obtidos de vacas soronegativas.

Altreuther et al. (2001) também conseguiram infectar monócitos bovinos *in vitro*, entretanto, não encontraram alterações na expressão de seus antígenos de superfície, bem como na transcrição de certas citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12).

Deste modo, apesar dos mecanismos ainda estarem por ser elucidados, quer por sua ação direta nas células infectadas, quer por meio da indução de diferentes perfis de citocinas, a infecção pelo VLB promove importantes alterações referentes à resposta imunitária do hospedeiro, aviltando uma possível interferência na necessária eficiência da mesma.

Os bovinos são constantemente desafiados por agentes patogênicos que podem deflagrar enfermidades passíveis de promover indesejáveis alterações em seus índices de produção. Assim, a ineficiência da defesa imunitária pode promover um aumento da incidência de enfermidades que tolhem o bem-estar animal e reduzem sua produtividade.

Além disso, um efeito imunossupressivo nestes animais pode interferir no resultado de exames laboratoriais que necessitem apropriado desempenho do sistema imunitário (tanto os que avaliam a resposta humoral, como os exames sorodiagnósticos, ou aqueles que avaliam a resposta celular, como, por exemplo, o teste de tuberculina, para o diagnóstico de tuberculose), contribuindo para a perpetuação de enfermidades no rebanho com a presença não diagnosticada de portadores disseminando agentes infecciosos a animais sadios.

Ainda, um possível estabelecimento de imunossupressão induzido pela infecção pelo VLB pode interferir na qualidade da resposta a antígenos vacinais, mantendo os animais vacinados (e, supostamente, protegidos) em condições inadequadas frente às possíveis infecções.

Neste ensejo, a resposta de animais em programas nacionais de vacinação que visam o

controle e/ou a erradicação de enfermidades pode estar comprometida, caso a infecção pelo VLB interfira com a qualidade da resposta imunitária.

Dentre tais enfermidades, a Febre aftosa traz sérias consequências sócio-econômicas, com reflexos econômicos para a produção primária do País, devido às sanções comerciais de outros países em relação ao comércio internacional de produtos e subprodutos de origem animal e, inclusive, de produtos agrícolas.

No Brasil, inserido na meta de eliminação da enfermidade do Continente Sulamericano, estabelecida pelo Plano Hemisférico de Erradicação da Febre aftosa (PHEFA), foram tomadas ações, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no desenvolvimento de estratégias para combater a doença (BRASIL, 2009). Para tal, implantou-se o Programa Nacional de Erradicação da Febre aftosa (PNEFA).

O PNEFA tem como objetivo erradicar a doença em todo território nacional e manter esta condição, apoiando-se num sistema de vigilância sanitária, na manutenção dos serviços de veterinária oficial e na participação da comunidade. Apresenta, entre suas estratégias, a modernização do sistema de vigilância epidemiológica, o controle de movimentação de animais, produtos e subprodutos e controle dos procedimentos de produção, comercialização e aplicação de vacina.

Posto que, deste modo, a vacinação contra o vírus da Febre aftosa é compulsória nos animais criados em território brasileiro, a presença de uma enfermidade que possa alterar, ou mesmo restringir, a resposta imunitária aos antígenos providos por tal vacinação pode, por fim, comprometer o objetivo do PNEFA.

Assim, baseando-se na hipótese de que o VLB, além de promover alterações neoplásicas deletérias, altera qualitativa e quantitativamente a resposta imunológica dos animais infectados e, além disso, de modo diverso daquele relatado em ovinos experimentalmente infectados, este estudo avaliou aspectos desta resposta frente estímulo antigênico provido pela vacinação contra o vírus da Febre aftosa em bovinos naturalmente infectados pelo VLB.

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo avaliar aspectos da resposta imunitária de bovinos naturalmente infectados pelo VLB, antes e após desafio com antígeno fornecido por vacinação contra o vírus da febre aftosa, em diferentes formas de apresentação da infecção, comparando-os com aqueles verificados em bovinos não infectados.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. quantificar subpopulações de leucócitos do sangue periférico obtido de fêmeas bovinas negativas no diagnóstico para LEB e de fêmeas bovinas naturalmente infectadas pelo VLB, alinfocitóticas e manifestando LP, antes e após o desafio antigênico;
- b. determinar os índices de morte celular (por apoptose e por necrose) de leucócitos do sangue periférico obtido de fêmeas bovinas negativas no diagnóstico para LEB e de fêmeas bovinas naturalmente infectadas pelo VLB, alinfocitóticas e manifestando LP, antes e após o desafio antigênico;
- c. determinar os índices de proliferação *in vitro* de linfócitos do sangue periférico obtido de fêmeas bovinas negativas no diagnóstico para LEB e de fêmeas bovinas naturalmente infectadas pelo VLB, alinfocitóticas e manifestando LP, antes e após o desafio antigênico;
- d. quantificar as concentrações dos isotipos de imunoglobulinas IgG1, IgG2, IgM e IgA no soro sanguíneo obtido de fêmeas bovinas negativas no diagnóstico para LEB e de fêmeas bovinas naturalmente infectadas pelo VLB, alinfocitóticas e manifestando LP, antes e após o desafio antigênico;
- e. quantificar as concentrações das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-12 no soro sanguíneo obtido de fêmeas bovinas negativas no diagnóstico para LEB e de fêmeas bovinas naturalmente infectadas pelo VLB, alinfocitóticas e manifestando LP, antes e

após o desafio antigênico, antes e após o desafio antigênico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As avaliações da resposta imunitária propostas foram efetuadas em amostras sanguíneas coletadas de 30 bovinos selecionados, separados em grupos segundo o sorodiagnóstico para LEB e os resultados dos leucogramas realizados em 274 animais, de acordo com delineamento esquematizado na figura 7.

Figura 7 – Resumo esquemático do delineamento experimental adotado no presente estudo – São Paulo – 2010

Foram avaliados dez animais com sorodiagnóstico negativo (grupo SN); dez animais com sorodiagnóstico positivo, alinfocitóticos (grupo AL); e dez animais com sorodiagnóstico positivo, apresentando LP (grupo LP).

Após a triagem destes animais, as amostras sanguíneas utilizadas para os ensaios propostos foram coletadas em 8 tempos: antes do desafio antigênico proporcionado pela vacinação contra a Febre aftosa; e depois do desafio, uma vez por semana, durante sete semanas, baseando-se em metodologia empregada por Garcia (1992).

4.1 ANIMAIS EMPREGADOS

Para a seleção dos animais, foram coletadas amostras sanguíneas de 274 fêmeas bovinas

em lactação, da raça Holandês Preto e Branco, com idade superior a 24 meses, oriundas de rebanhos localizados no Estado de São Paulo. Os animais apresentavam bom estado nutricional, não haviam sido submetidos a tratamento com glicocorticóides nos últimos 30 dias, assim como não se encontravam em fase puerperal.

Novas coletas foram realizadas, nos mesmos animais, com um intervalo de, no mínimo, 90 dias após a primeira coleta, para a verificação de possível soroconversão e da persistência da linfocitose.

4.2 COLETAS DE SANGUE

Foi coletada de cada animal, por venopunção coccígea, utilizando-se sistema a vácuo, uma amostra de sangue em tubo siliconizado sem anticoagulante, com capacidade de 10 mL, e agulha para múltiplas coletas (25 mm X 8 mm) do sistema Vacutainer[®] (Becton Dickinson[™], San Diego, CA). Tais amostras foram identificadas e transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Imunodiagnóstico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

O soro, obtido após a centrifugação das amostras por 10 minutos a 3.000 rpm (Centrífuga CELM LS-3 plus[®] – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, SP), foi conservado à temperatura de -20°C até a realização do sorodiagnóstico para LEB (para as amostras dos 274 animais triados) e da quantificação de imunoglobulinas e de citocinas séricas (para as amostras coletadas dos 30 animais selecionados, a cada tempo de coleta).

Foi também coletada, de cada animal, por venopunção coccígea, uma amostra em tubo siliconizado com ácido etilenodiamino tetra-acético (“Ethylenediamine Tetraacetic Acid” – EDTA) tripotássico (capacidade para 5 mL), do sistema Vacutainer[®], que também foi identificada e transportada até o laboratório. Tais amostras foram utilizadas para a realização dos leucogramas empregados na triagem dos animais, assim como, nos animais selecionados, em leucogramas a cada tempo de coleta.

Além disso, foram também coletadas, de cada animal selecionado, a cada tempo de coleta, duas amostras em tubo siliconizado com heparina (capacidade para 10 mL), do sistema Vacutainer[®]. Estas amostras foram utilizadas para os ensaios de quantificação das subpopulações leucocitárias e de morte celular, assim como para a separação dos linfócitos para os ensaios de proliferação celular.

4.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA

O número total de leucócitos por μL de sangue foi mensurado através de contagem automática (ABX Micros ABC Vet[®] – Horiba ABX Brasil, São Paulo, SP) e a contagem diferencial foi feita por meio de esfregaços sangüíneos corados pela técnica de Rosenfeld (1947), sendo a diferenciação do padrão leucocitário feita em microscópio óptico, com aumento de 400X.

Foram considerados, como referência para as contagens leucocitárias dos animais, os dados obtidos por Távora (1998), adaptados de Garcia (1989) e Birgel Júnior (1991) sumarizados na tabela 1. Além disso, a confirmação da linfocitose persistente foi feita com dois leucogramas consecutivos a intervalos de, no mínimo, 90 dias, segundo especificado por Parodi (1987).

Tabela 1 – Valores do leucograma¹ de fêmeas bovinas sadias, estratificadas segundo a idade, criadas no Estado de São Paulo, utilizados como referência no presente trabalho – São Paulo – 2010

Células	Idade (meses)			
	24 $\pm$ 36	36 $\pm$ 48	48 $\pm$ 60	60 $\pm$ 72
Leucócitos/ μL	15.533 ($\pm$ 4.846)	16.113 ($\pm$ 5.571)	16.004 ($\pm$ 7.517)	12.050 ($\pm$ 3.151)
Neutrófilos/ μL	3.797 ($\pm$ 1.497)	4.145 ($\pm$ 3.421)	3.443 ($\pm$ 1.287)	3.033 ($\pm$ 1.374)
Eosinófilos/ μL	1.320 ($\pm$ 1.061)	1.079 ($\pm$ 659)	1.656 ($\pm$ 1.284)	1.145 ($\pm$ 564)
Basófilos/ μL	89 ($\pm$ 112)	75 ($\pm$ 105)	107 ($\pm$ 130)	64 ($\pm$ 106)
Linfócitos/ μL	10.086 ($\pm$ 4.316)	10.578 ($\pm$ 5.094)	10.580 ($\pm$ 6.813)	7.557 ($\pm$ 2.759)
Monócitos/ μL	275 ($\pm$ 260)	243 ($\pm$ 193)	252 ($\pm$ 251)	262 ($\pm$ 172)

¹ Valores expressos em número absoluto ($\pm$ desvio padrão).

Fonte: Távora (1998).

4.4 SORODIAGNÓSTICO

Para a detecção dos anticorpos séricos específicos anti-VLB, foi empregada a técnica da

Imunodifusão Radial Dupla de Ouchterlony (Imunodifusão em Agar Gel – IDAG), conforme preconizado pela Organização Mundial para Saúde Animal (OIE, 2003). Para tal, foi utilizado o Kit comercial (Antígeno para diagnóstico de Leucose Enzoótica Bovina – Produção: Laboratório TECPAR, Curitiba, PR; Controle de qualidade: MAPA) com antígeno glicoprotéico (gp51), extraído do envelope do VLB.

Buscando-se maior confiabilidade na formação dos grupos experimentais, foram, também, utilizados Kits comerciais de ELISA (Bovine Leukemia Virus Antibody Test Kit[®] – VMRD, Inc., Pullman, WA, USA; n.º. cat. 284-5) na confirmação do diagnóstico de LEB.

Considerou-se um animal positivo para a LEB, aquele diagnosticado como sororreagente no teste IDAG (de maior especificidade), e negativo, aquele apresentando diagnóstico negativo no teste ELISA (de maior sensibilidade), de acordo com comparação realizada por Choi, Liu e Buehring (2002).

4.5 DESAFIO ANTIGÊNICO

Após a primeira coleta, os animais foram desafiados através de vacinação contra o vírus da febre aftosa, utilizando-se de vacina oleosa comercial (Aftovacin[®] Oleosa – Produção: Intervet/Schering-Plough, Cotia, SP; Controle de qualidade: MAPA), provendo antígenos dos sorotipos inativados O1 Campos, A24 Cruzeiro e C3 Indaial do vírus. Seguiram-se período e protocolo estabelecidos pelo MAPA.

4.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL

As classes de imunoglobulinas séricas IgG1, IgG2, IgM e IgA foram quantificadas, a cada tempo de coleta, por imunodifusão radial simples (CARLI et al., 1999), com o emprego de Kits comerciais (Bovine IgG(1) RID Kit[®] – Range 94-750 mg/dL; n.º. cat. 241-60; Bovine IgG(2) RID Kit[®] – Range 125-1000 mg/dL; n.º. cat. 242-60; Bovine IgA RID Kit[®] – Range 50-400 mg/dL; n.º. cat. 243-60; Bovine IgM RID Kit[®] – Range 62-500 mg/dL; n.º. cat. 246-60; – VMRD, Inc., Pullman, WA, USA), seguindo os protocolos determinados pelo fabricante.

4.7 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO E MORTE CELULAR

Os ensaios de proliferação celular induzido por Concanavalina-A (Con-A) e por LPS de *E. coli*, assim como os de morte celular por apoptose, com Anexina-V, ou por necrose, com Iodeto de Propídio (PI), foram conduzidos segundo técnicas empregadas por Orlik e Splitter (1996) e Debacq et al. (2006), com algumas modificações, expostas a seguir.

4.7.1 Avaliação da Proliferação de Linfócitos

Para a avaliação da proliferação de linfócitos, em cada amostra sanguínea e a cada tempo de coleta, procedeu-se à separação de leucócitos mononucleares, por gradiente de concentração, como se segue:

Para cada animal, das amostras coletadas em tubos com heparina, duas alíquotas de 5 mL foram transferidas para dois tubos de poliestireno de 15 mL individualizados, em que, previamente, haviam sido colocados 5 mL de meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) (MegaCell™ RPMI-1640 Medium – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; n.º. cat. M3817). As alíquotas assim diluídas foram gentilmente colocadas por sobre 5 mL de Ficoll® (densidade 1,077) (Histopaque® -1077 – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; n.º. cat. 10771) em dois novos tubos de poliestireno de 50 mL individualizados, e centrifugadas a 700 x G, por 40 minutos, a 4° C.

Após a centrifugação, a camada de células mononucleares de cada tubo foi retirada, utilizando-se de pipetas Pasteur estéreis, e transferida para novos tubos de poliestireno de 15 mL, em que, previamente, haviam sido colocados 5 mL de meio RPMI. A estes tubos, foi adicionado mais meio RPMI, até um volume final de 10 mL. Eles foram, então, centrifugados a 400 x G, por 10 minutos, a 4° C.

Após esta centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e procedeu-se à lise de eritrócitos nos botões celulares formados, por duas vezes. Para tal, foram adicionados a cada tubo 2 mL de NaCl a 0,2% e, esperados 20 segundos, 2 mL de NaCl a 1,6%, para a recomposição da solução fisiológica. Então, as amostras foram submetidas à centrifugação a 400 x G, por 10 minutos, a 4° C.

Após esta nova centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e os botões celulares foram

ressuspensos em 1 mL de meio RPMI, de onde foram retiradas alíquotas para a contagem de células viáveis, em câmaras de Newbauer, por exclusão do Azul de Tripán.

Após a separação e contagem dos leucócitos mononucleares, para cada amostra, duas alíquotas, com a concentração de 5×10^6 leucócitos mononucleares viáveis cada, foram transferidas para tubos de poliestireno (capacidade 3 mL). Em um dos tubos de cada animal foi adicionado 1 μ L de uma solução 5 mM de éster de succinimidil diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) (5-(and -6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl Ester (5(6)-CFDA,SE; CFSE) – mixed isomers – Molecular Probes™, Eugene, OR, USA; n.º. cat. C1157). Estes tubos foram incubados em estufa para cultura de células, a 37° C e com 5% de CO₂, por 20 minutos. Para a verificação de auto-fluorescência celular, a um tubo de cada animal não foi adicionado CFSE.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 400 x G, por 10 minutos, a 4° C, desprezou-se o sobrenadante e os botões celulares foram ressuspensos em 1 mL de meio RPMI, de onde foram retiradas alíquotas para nova contagem de células viáveis, em câmaras de Newbauer, por exclusão do Azul de Tripán.

Nove alíquotas das amostras em que foi adicionado CFSE, com a concentração de 2×10^5 leucócitos mononucleares viáveis cada, foram transferidas para poços de placas (com 96 poços) (Corning® Costar® cell culture plates 96 well – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; n.º. cat. CLS3790). Para a avaliação do índice de proliferação celular após estímulo *in vitro* com mitógenos, em três alíquotas de cada amostra, foi adicionado 1 μ g de Con-A (Concanavalin A from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; n.º. cat. C5275). Do mesmo modo, em outras três alíquotas de cada amostra, foram adicionados 2,5 μ g de LPS de *Escherichia coli* (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 055:B5 – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; n.º. cat. L6529). As outras três alíquotas de cada amostra não receberam a adição de quaisquer mitógenos, constituindo amostras sem estímulo *in vitro*.

Para a calibragem do citômetro de fluxo, através da verificação da auto-fluorescência celular, uma alíquota contendo 2×10^5 leucócitos mononucleares viáveis, das amostras em que não foi adicionado CFSE foi transferida para um dos poços.

As placas assim preparadas foram incubadas em estufa para cultura de células, a 37° C e com 5% de CO₂, por 72 horas.

Após o período de incubação, amostras em triplicata do mesmo animal e estímulo foram transferidas para um único tubo de citometria. Cinquenta mil linfócitos de cada amostra foram analisados em citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson Immunocytometry

System™, San Diego, CA), no Laboratório de Neuroimmunomodulação do Departamento de Patologia Experimental e Comparada, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os esquemas apresentados nas figuras 8 e 9 resumem o protocolo utilizado para o ensaio de proliferação linfocitária.

Figura 8 – Resumo esquemático do ensaio de proliferação de linfócitos adotado no presente estudo. A: separação de células mononucleares por gradiente de concentração, lise de eritrócitos e quantificação de células viáveis – São Paulo – 2010

Figura 9 – Resumo esquemático do ensaio de proliferação de linfócitos adotado no presente estudo.
B: incorporação de CFSE, incubação para proliferação celular e leitura em citômetro de fluxo – São Paulo – 2010

O índice de proliferação celular foi mensurado, segundo metodologia empregada por Asquith et al. (2006a), utilizando-se do programa FlowJo[®], versão 7.2.5 (Tree Star[™], Inc., Ashland, OR).

4.7.2 Avaliação da Morte Celular

A avaliação de células em que estava ocorrendo processo de morte por apoptose foi feita utilizando-se de anexina-V, conjugada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC). Aquelas em que ocorria processo de morte por necrose foram discriminadas por meio da incorporação de PI, utilizando-se de kits comerciais (APOPTTEST™-FITC – Dako Denmark A/S, Copenhagen, Dinamarca; n°. cat. K2350).

Para tal, após a retirada das alíquotas utilizadas para os ensaios de proliferação de linfócitos, de cada amostra do sangue coletado em tubos com heparina, duas alíquotas de 100 µL foram transferidas para dois tubos de citometria, aos quais já havia sido colocado 1 mL de solução salina fosfatada (PBS). Para a lise dos eritrócitos, foram adicionados a cada tubo 2 mL de NaCl a 0,2% e, esperados 20 segundos, 2 mL de NaCl a 1,6%, para a recomposição da solução fisiológica. Então, as amostras foram submetidas à centrifugação a 400 x G, por 8 minutos, a 4° C.

Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se a lise de eritrócitos nos botões celulares formados. Desprezou-se o sobrenadante após nova centrifugação a 400 x G, por 8 minutos, a 4° C, e os botões celulares foram ressuspensos em 100 µL tampão de ligação (Hepes, 10 mM; NaCl, 150 mM; KCl, 5 mM; MgCl₂, 1 mM; CaCl₂, 1,8 mM).

Para cada amostra, em um dos tubos foi adicionado 2,5 ng de anexina-V. As amostras, assim preparadas, foram incubadas por 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Após a incubação, nos tubos em que foi colocada a anexina-V foi adicionado 625 ng de PI. Um dos tubos de cada amostra permaneceu apenas com a suspensão de leucócitos, para a verificação de auto-fluorescência celular.

As amostras foram, imediatamente, encaminhadas ao Laboratório de Técnicas Imunológicas Aplicadas à Morfofisiologia do Departamento de Cirurgia (VCI), ao Laboratório de Neuroimunomodulação do Departamento de Patologia Experimental e Comparada, ambos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, ou à Unidade de Separação Celular do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para serem analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, CA).

O esquema apresentado na figura 10 resume o protocolo utilizado para o ensaio de avaliação da morte leucocitária.

Figura 10 – Resumo esquemático do ensaio de avaliação da morte de leucócitos adotado no presente estudo – São Paulo – 2010

Por citometria de fluxo, dez mil leucócitos de cada amostra foram analisados quanto à fluorescência emitida, utilizando-se do programa FlowJo[®], versão 7.2.5. Para a determinação dos índices de morte celular, foram consideradas células em que estava ocorrendo morte por apoptose, aquelas emitindo apenas fluorescência indicativa da incorporação da anexina-V. Células emitindo fluorescência indicativa da incorporação do PI foram consideradas como sofrendo processo de morte por necrose.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

Foram determinadas as quantidades séricas das citocinas IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α nas amostras obtidas dos animais dos diferentes grupos experimentais, a cada tempo de coleta, utilizando-se de kits comerciais de ELISA (Bovine IFN-gamma ELISA Kit – Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA; n°. cat. KBC1231; Bovine IFN gamma Screening Set; n°. cat. ESS0026B; Human IL-10 ELISA Kit; n°. cat. EHIL105; Human IL-12 (total) ELISA Kit; n°. cat. EH2IL12T; – Thermo Scientific Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, USA), de acordo com técnicas empregadas por Platt et al. (2008) e Souza et al. (2008), seguindo os protocolos determinados pelos fabricantes.

4.9 QUANTIFICAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS

As amostras foram preparadas para avaliação da expressão de marcadores celulares, por citometria de fluxo, conforme técnica utilizada por Fossum et al. (1988), com algumas modificações, descritas a seguir.

Das amostras sanguíneas coletadas em tubos com heparina, após a retirada das alíquotas utilizadas para os ensaios de proliferação de linfócitos e de morte celular, 2 mL de sangue foram transferidos para tubos de poliestireno de 15 mL individualizados, em que, previamente, haviam sido colocados 2 mL de PBS. Para a lise dos eritrócitos, foram adicionados a cada tubo 5 mL de NaCl a 0,2% e, esperados 20 segundos, 5 mL de NaCl a 1,6%, para a recomposição da solução fisiológica. Após, as amostras foram submetidas à centrifugação a 400 x G, por 10 minutos, a 4° C.

Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se a lise de eritrócitos nos botões celulares formados. Desprezou-se o sobrenadante após nova centrifugação a 400 x G, por 10 minutos, a 4° C, e os botões celulares foram ressuspensos em 1 mL de PBS, de onde foram retiradas amostras para a contagem de células viáveis, em câmaras de Neubauer, por exclusão do Azul de Tripan.

De cada amostra, alíquotas com uma concentração de 1×10^6 leucócitos viáveis foram transferidas para quatro tubos para citometria em que, previamente, havia sido colocado 1 mL

de PBS. Em um tubo de cada animal foram adicionados 1 µg de anticorpos monoclonais, produzidos em camundongos, anti-CD3 bovino (isotipo IgG1) (Mouse Anti-bovine CD3 – VMRD, Inc., Pullman, WA, USA; n°. cat. MM1A), anti-CD4 bovino (isotipo IgG2a) (Mouse Anti-bovine CD4 – VMRD, Inc., Pullman, WA, USA; n°. cat. IL-A11) e anti-CD8 bovino (isotipo IgM) (Mouse Anti-bovine CD8 – VMRD, Inc., Pullman, WA, USA; n°. cat. BAQ111A).

Ao segundo tubo de cada animal, foram adicionados 1 µg de anticorpos monoclonais anti-CD21 bovino (isotipo IgM) (Mouse Anti-bovine B-lymphocytes (B-B2) – VMRD, Inc., Pullman, WA, USA; n°. cat. BAQ44A), anti-CD5 bovino (isotipo IgG2a) (Mouse Anti-bovine CD5 – VMRD, Inc., Pullman, WA, USA; n°. cat. B29A) e anti-CD11b bovino (isotipo IgG1) (Mouse Anti-bovine CD11b – VMRD, Inc., Pullman, WA, USA; n°. cat. MM12A).

A um terceiro tubo de cada animal foram adicionados 1 µg de anticorpos monoclonais anti-CD2 bovino (isotipo IgG2a) (Mouse Anti-bovine CD2 – VMRD, Inc., Pullman, WA, USA; n°. cat. 16-1E10), anti-CD14 bovino (isotipo IgG1) (Mouse Anti-bovine CD14 – VMRD, Inc., Pullman, WA, USA; n°. cat. MM61A) e anti-WC1 bovino (isotipo IgM) (Mouse Anti-bovine WC1-N1 – VMRD, Inc., Pullman, WA, USA; n°. cat. B7A1). Para a verificação de auto-fluorescência celular, um tubo de cada animal não recebeu anticorpos monoclonais.

Após 30 minutos sobre gelo, as amostras foram submetidas, duas vezes, à lavagem com solução de PBS. Para tal, foram centrifugadas a 400 x G, por 10 minutos, a 4° C, e os botões celulares foram ressuspensos em 1 mL de PBS.

Após as lavagens, às amostras em que haviam sido colocados anticorpos monoclonais primários foram adicionados 5 µg de anticorpos monoclonais secundários, produzidos em caprinos, anti-IgM de camundongos conjugados ao fluorocromo FITC (Goat Anti-mouse IgM-FITC – Caltag laboratories, Burlingame, CA, USA; n°. cat. M31601); 5 µg de anticorpos monoclonais secundários, produzidos em caprinos, anti-IgG1 de camundongos conjugados com cianina-5 (Cy-5) (Goat Anti-mouse IgG1-Cy-5 – Caltag laboratories, Burlingame, CA, USA; n°. cat. M32011); e 5 µg de anticorpos monoclonais secundários, produzidos em caprinos, anti-IgG2a de camundongos conjugados com ficoeritrina (PE) (Goat Anti-mouse IgG2a-PE – Caltag laboratories, Burlingame, CA, USA; n°. cat. M32204).

Após 30 minutos sobre gelo, em ambiente escuro, as amostras foram novamente submetidas, duas vezes, à lavagem com solução de PBS. Para tal, foram centrifugadas a 400 x G, por 10 minutos, a 4° C, e os botões celulares foram ressuspensos em 1 mL de PBS.

As amostras foram, assim, encaminhadas à Unidade de Separação Celular do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São

Paulo, para serem analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson Immunocytometry System™, San Diego, CA).

O esquema apresentado na figura 11 resume o protocolo utilizado para o ensaio de quantificação de subpopulações de leucócitos do sangue periférico.

Figura 11 – Resumo esquemático do ensaio de quantificação de subpopulações de leucócitos do sangue periférico (fenotipagem) adotado no presente estudo – São Paulo – 2010

Também para a fenotipagem leucocitária, dez mil leucócitos de cada amostra foram analisados quanto à fluorescência emitida utilizando-se do programa FlowJo®, versão 7.2.5. Verificou-se a porcentagem de células com fluorescências específicas de cada anticorpo

monoclonal secundário.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Conforme indicado por Callegari-Jacques (2003), foi verificada a normalidade da distribuição dos resultados, utilizando-se do teste de Anderson-Darling, e sua homoscedasticidade, utilizando-se do teste F (para dados que apresentaram distribuição normal) ou do teste de Lavene (para dados que não apresentaram distribuição normal).

Para a avaliação das diferenças entre as médias dos resultados obtidos, de acordo, respectivamente, com a ocorrência ou não de homoscedasticidade, foram feitos, para dados com distribuição normal, os testes de análise de variância (One-way ANOVA), seguida do teste de Tukey-Kramer ou o teste t; e, para dados que não apresentaram distribuição normal, o teste de Mann-Whitney ou o teste de Kruskal-Wallis.

Para todos os resultados, foram consideradas significantes as análises que apresentaram $p \leq 0,05$. Para tais análises, foi utilizado o software estatístico MINITAB[®], versão 15 (GlobalTech Informática[™], Belo Horizonte, MG).

5 RESULTADOS

Para a triagem dos animais utilizados, foram coletadas amostras sanguíneas de 274 fêmeas bovinas adultas em lactação. Estas fêmeas, com idade variando entre 24 e 72 meses, da raça Holandês Preto e Branco, eram oriundas de rebanhos localizados no Estado de São Paulo, apresentavam bom estado nutricional, não haviam sido submetidos a tratamento com glicocorticóides nos últimos 30 dias, assim como não se encontravam em fase puerperal. Destas, 133 (48,54%) foram diagnosticadas, por IDAG, como positivas para LEB (Figura 12).

Figura 12 – Resultado da imunodifusão em agar gel (IDAG) para diagnóstico de leucose enzoótica bovina em 274 vacas da raça Holandês Preto e Branco – São Paulo – 2010

Por sua vez, utilizando-se do teste ELISA (Figura 13), 231 amostras foram diagnosticadas como positivas (84,31%). Para a formação dos grupos experimentais, foram considerados positivos no sorodiagnóstico para a LEB, os 133 animais diagnosticados como sororreagentes no teste IDAG (de maior especificidade), e foram considerados negativos, os 43 animais apresentando diagnóstico negativo no teste ELISA (de maior sensibilidade).

Figura 13 – Resultado do teste ELISA para diagnóstico de leucose enzoótica bovina em 274 vacas da raça Holandês Preto e Branco – São Paulo – 2010

Para se determinar se os animais considerados positivos estavam manifestando LP, foram considerados, como referência, os dados obtidos por Távora (1998), adaptados de Garcia (1989) e Birgel Júnior (1991) (expostos na tabela 1).

Para tal, somaram-se três desvios padrão à contagem absoluta de linfócitos de cada animal avaliado. Desta forma, verificou-se que, dentre os 133 animais considerados positivos no sorodiagnóstico para a LEB, 27 animais (20,30% dos animais positivos e 9,85% do total) apresentavam linfocitose de tal monta (Figura 14).

Figura 14 – Distribuição (% sobre total) de 274 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função dos resultados da imunodifusão em gel de agar para diagnóstico de Leucose Enzoótica Bovina e do leucograma – São Paulo – 2010

Foram selecionados dez animais soronegativos (Grupo SN) e dez animais soropositivos (Grupo AL) com contagens leucocitárias (totais e diferenciais) dentro dos valores de referência, bem como dez animais soropositivos manifestando linfocitose persistente (Grupo LP).

Destes animais, foram coletadas amostras sanguíneas quatro dias antes do desafio antigênico, através da vacinação contra a Febre aftosa (tempo – T 0), além de novas amostras três (T 1), dez (T 2), 17 (T 3), 24 (T 4), 31 (T 5), 38 dias (T 6) e 45 dias (T 7) após o desafio, utilizadas para as avaliações propostas no presente trabalho.

Os valores médios ($\pm$ desvio padrão) verificados nas contagens totais de eritrócitos e leucócitos, assim como os valores médios absolutos ($\pm$ desvio padrão) dos leucogramas diferenciais observados nos animais selecionados, segundo o grupo experimental e a cada tempo de coleta, são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) do hemograma, em números absolutos, de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Experimentos, a cada tempo de coleta - São Paulo - 2016									
Tempo	Grupo	Eritrócitos	Leucócitos (x 10 ³ /μL)						
		(x 10 ⁶ /μL)	Totais	Linfócitos	Neutrófilos	Li:Ne	Eosinófilos	Basófilos	Monócitos
T 0	SN	5,46A (± 0,62)	8,78a (± 1,68)	4,13a (± 0,79)	3,78 (± 0,72)	1,09a (± 0,00)	0,68 (± 0,12)	0,09 (± 0,02)	0,18 (± 0,03)
	AL	5,23A (± 0,50)	9,25a (± 1,80)	4,35a (± 0,85)	3,98 (± 0,77)	1,09a (± 0,00)	0,74 (± 0,14)	0,09 (± 0,02)	0,19 (± 0,04)
	LP	5,37A (± 0,58)	33,93b (± 12,05)	29,18b (± 11,91)	3,73 (± 0,68)	7,82b (± 3,47)	0,68 (± 0,13)	0,14 (± 0,03)	0,20 (± 0,03)
T 1	SN	6,16B (± 0,74)	9,82a (± 1,85)	4,62a (± 0,77)	4,22 (± 0,77)	1,09a (± 0,00)	0,76 (± 0,10)	0,10 (± 0,01)	0,20 (± 0,03)
	AL	5,96B (± 0,63)	9,35a (± 1,64)	4,39a (± 0,72)	4,02 (± 0,70)	1,09a (± 0,00)	0,75 (± 0,15)	0,09 (± 0,02)	0,19 (± 0,03)
	LP	6,01B (± 0,55)	36,15b (± 11,79)	31,09b (± 11,89)	3,98 (± 0,71)	7,81b (± 3,03)	0,72 (± 0,17)	0,14 (± 0,01)	0,22 (± 0,04)
T 2	SN	5,78B (± 0,61)	8,70a (± 1,61)	4,09a (± 0,80)	3,74 (± 0,81)	1,09a (± 0,01)	0,68 (± 0,12)	0,09 (± 0,02)	0,17 (± 0,02)
	AL	6,03B (± 0,65)	8,57a (± 1,78)	4,03a (± 0,78)	3,68 (± 0,72)	1,10a (± 0,00)	0,69 (± 0,14)	0,09 (± 0,02)	0,17 (± 0,03)
	LP	6,20B (± 0,62)	34,95b (± 12,86)	30,06b (± 12,34)	3,84 (± 0,69)	7,83b (± 3,97)	0,70 (± 0,15)	0,14 (± 0,03)	0,21 (± 0,02)
T 3	SN	5,96B (± 0,56)	8,96a (± 1,75)	4,21a (± 0,73)	3,85 (± 0,61)	1,09a (± 0,00)	0,70 (± 0,11)	0,09 (± 0,01)	0,18 (± 0,04)
	AL	5,99B (± 0,64)	8,62a (± 1,55)	4,05a (± 0,81)	3,71 (± 0,70)	1,09a (± 0,00)	0,69 (± 0,16)	0,09 (± 0,02)	0,17 (± 0,03)
	LP	5,65B (± 0,53)	33,98b (± 12,66)	29,22b (± 12,02)	3,74 (± 0,69)	7,81b (± 3,01)	0,68 (± 0,10)	0,14 (± 0,01)	0,20 (± 0,03)
T 4	SN	5,84B (± 0,63)	8,64a (± 1,84)	4,06a (± 0,70)	3,72 (± 0,71)	1,09a (± 0,01)	0,67 (± 0,15)	0,09 (± 0,01)	0,17 (± 0,03)
	AL	5,83B (± 0,55)	9,08a (± 1,73)	4,27a (± 0,72)	3,91 (± 0,74)	1,09a (± 0,00)	0,73 (± 0,18)	0,09 (± 0,01)	0,18 (± 0,04)
	LP	5,75B (± 0,60)	34,85b (± 12,41)	29,97b (± 12,02)	3,83 (± 0,78)	7,83b (± 2,99)	0,70 (± 0,16)	0,14 (± 0,03)	0,21 (± 0,02)
T 5	SN	5,62B (± 0,54)	7,98a (± 1,69)	3,75a (± 0,81)	3,43 (± 0,86)	1,09a (± 0,00)	0,62 (± 0,09)	0,08 (± 0,02)	0,16 (± 0,03)
	AL	6,02B (± 0,52)	8,67a (± 1,71)	4,07a (± 0,73)	3,73 (± 0,67)	1,09a (± 0,00)	0,69 (± 0,12)	0,09 (± 0,02)	0,17 (± 0,03)
	LP	5,68B (± 0,60)	36,20b (± 11,49)	31,13b (± 12,87)	3,98 (± 0,66)	7,82b (± 3,40)	0,72 (± 0,11)	0,14 (± 0,01)	0,22 (± 0,02)
T 6	SN	5,58B (± 0,63)	7,72a (± 1,81)	3,63a (± 0,64)	3,32 (± 0,67)	1,09a (± 0,00)	0,60 (± 0,10)	0,08 (± 0,03)	0,15 (± 0,04)
	AL	6,11B (± 0,61)	8,17a (± 1,77)	3,84a (± 0,81)	3,51 (± 0,69)	1,09a (± 0,00)	0,65 (± 0,16)	0,08 (± 0,02)	0,16 (± 0,03)
	LP	6,04B (± 0,52)	36,90b (± 12,52)	31,73b (± 12,38)	4,06 (± 0,61)	7,82b (± 3,99)	0,74 (± 0,17)	0,15 (± 0,02)	0,22 (± 0,03)
T 7	SN	5,70B (± 0,51)	8,04a (± 1,80)	3,78a (± 0,89)	3,46 (± 0,63)	1,09a (± 0,00)	0,63 (± 0,11)	0,08 (± 0,02)	0,16 (± 0,03)
	AL	5,97B (± 0,66)	8,92a (± 1,75)	4,19a (± 0,71)	3,83 (± 0,68)	1,09a (± 0,00)	0,71 (± 0,09)	0,09 (± 0,03)	0,18 (± 0,03)
	LP	5,84B (± 0,49)	36,90b (± 11,96)	31,73b (± 11,79)	4,06 (± 0,57)	7,82b (± 2,93)	0,74 (± 0,12)	0,15 (± 0,02)	0,22 (± 0,04)

¹ **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo LP:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio. Resultados com letras minúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p < 0,001$, em um mesmo tempo de coleta. Resultados com letras maiúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p < 0,05$, entre os tempos de coleta. **Li:Ne:** relação linfócitos:neutrófilos.

Observou-se que, em todos os tempos de coleta, os valores médios das contagens totais

de leucócitos e absolutas de linfócitos foram maiores entre os animais manifestando LP ($p<0,001$). Também, as relações entre os valores médios absolutos das contagens de linfócitos e de neutrófilos, a cada tempo de coleta, foram maiores ($p<0,001$), quando avaliados os dados obtidos dos leucogramas de animais manifestando LP. Além disso, verificou-se que as quantidades médias de eritrócitos foram maiores ($p<0,005$) após o desafio antigênico, independente do grupo a que os animais pertenciam.

Por sua vez, os valores médios ($\pm$ desvio padrão) verificados nas contagens totais de eritrócitos e leucócitos, assim como os valores médios absolutos ($\pm$ desvio padrão) dos leucogramas diferenciais observados nos hemogramas dos 30 animais selecionados, a cada tempo de coleta, são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) do hemograma, em números absolutos, de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	Leucócitos (x 10 ³ /μL)						
		Totais	Linfócitos	Neutrófilos	Li:Ne	Eosinófilos	Basófilos	Monócitos
T 0	5,34a ($\pm 0,62$)	15,67 ($\pm 11,62$)	10,89 ($\pm 11,53$)	3,84 ($\pm 0,64$)	2,89 ($\pm 3,08$)	0,70 ($\pm 0,12$)	0,10 ($\pm 0,03$)	0,19 ($\pm 0,03$)
T 1	6,04b ($\pm 0,72$)	16,65 ($\pm 10,78$)	11,59 ($\pm 11,03$)	4,08 ($\pm 0,62$)	2,84 ($\pm 3,02$)	0,75 ($\pm 0,11$)	0,11 ($\pm 0,02$)	0,20 ($\pm 0,02$)
T 2	5,99b ($\pm 0,61$)	15,65 ($\pm 11,09$)	10,99 ($\pm 10,87$)	3,75 ($\pm 0,66$)	2,93 ($\pm 2,92$)	0,69 ($\pm 0,10$)	0,10 ($\pm 0,02$)	0,18 ($\pm 0,04$)
T 3	5,89b ($\pm 0,68$)	15,49 ($\pm 11,28$)	10,82 ($\pm 10,48$)	3,76 ($\pm 0,66$)	2,88 ($\pm 2,91$)	0,69 ($\pm 0,12$)	0,10 ($\pm 0,03$)	0,18 ($\pm 0,02$)
T 4	5,81b ($\pm 0,71$)	15,81 ($\pm 10,76$)	11,05 ($\pm 11,01$)	3,82 ($\pm 0,71$)	2,89 ($\pm 3,01$)	0,70 ($\pm 0,14$)	0,10 ($\pm 0,02$)	0,19 ($\pm 0,02$)
T 5	5,80b ($\pm 0,69$)	15,78 ($\pm 10,89$)	11,18 ($\pm 10,75$)	3,70 ($\pm 0,58$)	3,02 ($\pm 2,99$)	0,68 ($\pm 0,10$)	0,10 ($\pm 0,02$)	0,18 ($\pm 0,03$)
T 6	5,91b ($\pm 0,69$)	15,68 ($\pm 10,86$)	11,21 ($\pm 10,05$)	3,59 ($\pm 0,59$)	3,12 ($\pm 3,03$)	0,66 ($\pm 0,11$)	0,10 ($\pm 0,02$)	0,18 ($\pm 0,02$)
T 7	5,85b ($\pm 0,60$)	16,09 ($\pm 10,79$)	11,40 ($\pm 10,96$)	3,77 ($\pm 0,63$)	3,02 ($\pm 3,00$)	0,69 ($\pm 0,11$)	0,10 ($\pm 0,03$)	0,18 ($\pm 0,03$)

¹ **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio. Resultados com letras divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p=0,012$, entre os tempos de coleta. **Li:Ne:** relação linfócitos:Neutrófilos.

Avaliando-se os 30 animais, sem a separação por grupos a que pertenciam, verificou-se, também, que as quantidades médias de eritrócitos foram maiores ($p=0,012$) após o desafio antigênico.

Para uma melhor observação das diferenças encontradas, alguns dos valores também estão apresentados sob a forma de figuras. Os valores médios verificados nas contagens totais de eritrócitos nos animais selecionados, segundo o grupo experimental e a cada tempo de coleta, são apresentados na Figura 15.

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

** : diferença com $p=0,012$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 15 – Valores médios da contagem de eritrócitos (por μL de sangue) de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Já os valores médios verificados nas contagens totais de leucócitos nos animais selecionados, segundo o grupo experimental e a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 16.

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

*: diferença com p<0,001, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

Figura 16 – Valores médios da contagem total de leucócitos (por μL de sangue) de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Também, os valores absolutos médios verificados nas contagens diferenciais de linfócitos nos animais selecionados, segundo o grupo experimental e a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 17.

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

*: diferença com $p < 0,001$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

Figura 17 – Valores absolutos médios da contagem diferencial de linfócitos (por μL de sangue) de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Por fim, os valores médios das relações entre os valores absolutos de linfócitos e os valores absolutos de neutrófilos verificados nos leucogramas dos animais selecionados, segundo o grupo experimental e a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 18.

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

*: diferença com $p < 0,001$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

Figura 18 – Valores médios das relações entre os valores absolutos de linfócitos e os valores absolutos de neutrófilos verificados nos leucogramas de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

5.1 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL

As classes de imunoglobulinas séricas IgG1, IgG2, IgM e IgA foram quantificadas em duplicata, a cada tempo de coleta, por imunodifusão radial simples, empregando-se Kits comerciais. Os resultados médios ($\pm$ desvio padrão) observados em cada grupo experimental são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) das quantidades de imunoglobulinas séricas (mg/dL) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Grupo	IgM	IgG1	IgG2	IgA
T 0	SN	199,00 ($\pm$ 134,99)	341,15 ($\pm$ 25,05)	549,66 aA ($\pm$ 103,58)	105,92 ($\pm$ 44,66)
	AL	213,64 ($\pm$ 126,93)	345,98 ($\pm$ 44,18)	654,82 aB ($\pm$ 143,50)	88,59 ($\pm$ 53,44)
	LP	193,89 ($\pm$ 116,59)	299,81 ($\pm$ 58,08)	549,32 aA ($\pm$ 201,65)	91,80 ($\pm$ 52,97)
T 1	SN	268,00 ($\pm$ 105,68)	346,46 ($\pm$ 30,17)	597,30 bA ($\pm$ 191,21)	116,52 ($\pm$ 60,13)
	AL	265,91 ($\pm$ 124,05)	365,31 ($\pm$ 36,54)	671,74 bB ($\pm$ 132,27)	107,85 ($\pm$ 63,88)
	LP	257,78 ($\pm$ 134,17)	323,43 ($\pm$ 37,58)	630,37 bA ($\pm$ 159,57)	115,34 ($\pm$ 63,66)
T 2	SN	256,50 ($\pm$ 137,68)	357,09 ($\pm$ 35,87)	733,15 c ($\pm$ 285,89)	95,33 ($\pm$ 71,50)
	AL	224,09 ($\pm$ 134,29)	341,15 ($\pm$ 23,77)	768,85 c ($\pm$ 207,62)	107,85 ($\pm$ 42,85)
	LP	219,44 ($\pm$ 50,71)	329,34 ($\pm$ 23,44)	711,43 c ($\pm$ 202,61)	68,26 ($\pm$ 55,83)
T 3	SN	245,00 ($\pm$ 153,33)	351,78 ($\pm$ 22,41)	780,42 dA ($\pm$ 238,51)	148,30 ($\pm$ 83,56)
	AL	286,82 ($\pm$ 172,67)	350,81 ($\pm$ 32,05)	801,33 dA ($\pm$ 161,29)	127,11 ($\pm$ 67,00)
	LP	270,56 ($\pm$ 95,83)	329,34 ($\pm$ 23,44)	754,85 dB ($\pm$ 232,07)	127,11 ($\pm$ 74,90)
T 4	SN	314,00 ($\pm$ 96,98)	335,84 ($\pm$ 16,81)	780,42 dA ($\pm$ 228,84)	105,92 ($\pm$ 97,34)
	AL	286,82 ($\pm$ 164,84)	321,82 ($\pm$ 49,13)	829,08 dA ($\pm$ 180,71)	117,48 ($\pm$ 31,94)
	LP	232,22 ($\pm$ 69,11)	329,34 ($\pm$ 44,29)	723,83 dB ($\pm$ 183,06)	103,57 ($\pm$ 70,62)
T 5	SN	222,00 ($\pm$ 160,82)	335,84 ($\pm$ 30,17)	788,98 dA ($\pm$ 253,88)	95,33 ($\pm$ 51,17)
	AL	224,09 ($\pm$ 134,29)	316,99 ($\pm$ 36,54)	771,90 cdA ($\pm$ 262,87)	127,11 ($\pm$ 47,37)
	LP	245,00 ($\pm$ 99,59)	323,43 ($\pm$ 37,58)	728,38 cdB ($\pm$ 200,26)	80,03 ($\pm$ 55,83)
T 6	SN	256,50 ($\pm$ 175,25)	325,21 ($\pm$ 25,67)	767,02 cdA ($\pm$ 182,92)	116,52 ($\pm$ 60,13)
	AL	255,45 ($\pm$ 95,59)	321,82 ($\pm$ 26,81)	801,33 dA ($\pm$ 178,02)	107,85 ($\pm$ 42,85)
	LP	283,33 ($\pm$ 152,13)	305,72 ($\pm$ 53,15)	673,79 bcB ($\pm$ 238,38)	91,80 ($\pm$ 74,90)
T 7	SN	302,50 ($\pm$ 111,76)	335,84 ($\pm$ 16,81)	604,00 bA ($\pm$ 148,83)	84,74 ($\pm$ 54,70)
	AL	302,50 ($\pm$ 79,07)	316,99 ($\pm$ 38,54)	647,04 aA ($\pm$ 153,06)	98,22 ($\pm$ 49,48)
	LP	206,67 ($\pm$ 115,00)	288,00 ($\pm$ 70,31)	545,59 aB ($\pm$ 249,49)	68,26 ($\pm$ 55,83)

¹ **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo LP:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio. Resultados com letras maiúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p < 0,01$, em um mesmo tempo de coleta. Resultados com letras minúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p < 0,05$, entre os tempos de coleta.

Observou-se que não houve diferença nas concentrações séricas médias de IgG1, de

IgM e de IgA tanto entre os tempos de coleta, quanto, a cada tempo, entre animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

No entanto, verificou-se que as concentrações séricas médias de IgG2, antes (T0) e três dias após o desafio antigênico (T1), entre os animais pertencentes ao grupo AL foram maiores ($p=0,009$) que aquelas observadas nos animais pertencentes aos demais grupos experimentais.

Não houve diferença nas concentrações médias deste isotipo na coleta realizada dez dias após o desafio antigênico (T2), todavia, passados 17 dias do desafio antigênico (T3 em diante), as concentrações séricas médias de IgG2 observadas nos animais manifestando LP foram, a cada tempo de coleta, menores que aquelas verificadas nos animais pertencentes aos demais grupos experimentais ($p<0,01$).

Por sua vez, os valores médios ($\pm$ desvio padrão) verificados nas concentrações séricas médias de IgG1, IgG2, IgM e IgA, dos 30 animais selecionados, a cada tempo de coleta, são apresentados na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) das quantidades de imunoglobulinas séricas (mg/dL) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	IgM	IgG1	IgG2	IgA
T 0	202,83 ($\pm 122,61$)	330,52 ($\pm 47,12$)	588,12 a ($\pm 155,93$)	95,33 ($\pm 49,37$)
T 1	264,17 ($\pm 117,29$)	346,46 ($\pm 37,84$)	634,52 b ($\pm 159,41$)	112,99 ($\pm 60,52$)
T 2	233,50 ($\pm 114,40$)	342,92 ($\pm 29,55$)	739,72 c ($\pm 228,34$)	91,80 ($\pm 57,91$)
T 3	268,00 ($\pm 142,93$)	344,69 ($\pm 27,68$)	780,42 d ($\pm 204,57$)	134,17 ($\pm 73,25$)
T 4	279,50 ($\pm 121,37$)	328,75 ($\pm 38,69$)	781,28 d ($\pm 196,59$)	109,46 ($\pm 68,61$)
T 5	229,67 ($\pm 130,71$)	325,21 ($\pm 34,61$)	764,54 cd ($\pm 235,64$)	102,39 ($\pm 53,39$)
T 6	264,17 ($\pm 138,67$)	318,12 ($\pm 36,08$)	751,63 c ($\pm 199,72$)	105,92 ($\pm 58,35$)
T 7	233,50 ($\pm 110,35$)	314,58 ($\pm 47,84$)	602,26 a ($\pm 184,07$)	84,74 ($\pm 52,78$)

¹ **T 0**: quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1**: três; **T 2**: dez; **T 3**: 17; **T 4**: 24; **T 5**: 31; **T 6**: 38; e **T 7**: 45 dias após o desafio. Resultados com letras divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p<0,05$, entre os tempos de coleta.

Analisando-se todos os 30 animais durante todo o período de coletas, observou-se que as concentrações séricas médias de IgG2 verificadas após o desafio antigênico (T1 a T6) foram maiores ($p=0,038$) que aquelas obtidas antes do desafio (T0), retornando a valores semelhantes aos notados previamente ao desafio apenas na coleta realizada 45 dias após o

mesmo (T7).

Considerando-se cada grupo experimental, observou-se que tal comportamento foi similar ($p < 0,05$), excetuando-se que as concentrações séricas médias de IgG2 verificadas nos animais não infectados, 45 dias após o desafio antigênico (T7), ainda permaneciam maiores que aquelas obtidas antes do desafio (T0).

Para uma melhor visualização de sua dinâmica ao longo dos tempos de coleta, os valores séricos de cada classe de imunoglobulina verificados nos 30 animais selecionados, também são apresentados na figura 19.

¹ T 0: quatro dias antes do desafio antigênico; T 1: três; T 2: dez; T 3: 17; T 4: 24; T 5: 31; T 6: 38; e T 7: 45 dias após o desafio.

** : diferença com $p < 0,05$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo isotipo.

Figura 19 – Valores séricos de cada classe de imunoglobulina verificados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Do mesmo modo, os valores séricos de IgG2 verificados nos 30 animais selecionados, separados em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 20.

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

*: diferença com $p < 0,01$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p < 0,05$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 20 – Valores séricos de IgG2 verificados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Os valores séricos de IgG1 verificados nos 30 animais selecionados, separados em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 21.

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

Figura 21 – Valores séricos de IgG1 verificados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Os valores séricos de IgM verificados nos 30 animais selecionados, separados em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 22.

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

Figura 22 – Valores séricos de IgM verificados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Por fim, os valores séricos de IgA verificados nos 30 animais selecionados, separados em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 23.

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

Figura 23 – Valores séricos de IgA verificados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

5.2 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

Os índices médios ($\pm$ desvio padrão) de proliferação de linfócitos, de acordo com a presença e o tipo de estímulo *in vitro*, observados nos animais selecionados, segundo o grupo experimental e a cada tempo de coleta, são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Índices médios ($\pm$ desvio padrão) de proliferação de linfócitos, com e sem estímulo *in vitro*, observados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Grupo	Basal (sem estímulo)	Estímulo <i>in vitro</i>	
			Con-A	LPS
T 0	SN	0,79aA ($\pm$ 0,68)	0,78aA ($\pm$ 0,65)	0,79aA ($\pm$ 0,68)
	AL	0,64aA ($\pm$ 0,60)	0,67aA ($\pm$ 0,65)	0,63aA ($\pm$ 0,58)
	LP	0,30aB ($\pm$ 0,49)	0,35aB ($\pm$ 0,48)	0,34aB ($\pm$ 0,48)
T 1	SN	0,80a ($\pm$ 0,24)	0,70a ($\pm$ 0,33)	0,75a ($\pm$ 0,26)
	AL	0,66a ($\pm$ 0,22)	0,62a ($\pm$ 0,30)	0,62a ($\pm$ 0,24)
	LP	0,80b ($\pm$ 0,34)	0,83b ($\pm$ 0,35)	0,78b ($\pm$ 0,37)
T 2	SN	0,70ab ($\pm$ 0,55)	0,61ab ($\pm$ 0,50)	0,72a ($\pm$ 0,54)
	AL	0,53a ($\pm$ 0,38)	0,55a ($\pm$ 0,44)	0,60a ($\pm$ 0,46)
	LP	0,57ab ($\pm$ 0,22)	0,57ab ($\pm$ 0,30)	0,51ab ($\pm$ 0,23)
T 3	SN	0,56b ($\pm$ 0,25)	0,55bA ($\pm$ 0,34)	0,54bA ($\pm$ 0,31)
	AL	0,58a ($\pm$ 0,32)	0,65aA ($\pm$ 0,38)	0,63aA ($\pm$ 0,35)
	LP	0,69b* ($\pm$ 0,43)	0,83bB ($\pm$ 0,59)	0,79bB ($\pm$ 0,59)
T 4	SN	1,04c ($\pm$ 0,72)	1,13c ($\pm$ 0,74)	1,08c ($\pm$ 0,75)
	AL	1,06b ($\pm$ 0,88)	1,08b ($\pm$ 0,85)	1,08b ($\pm$ 0,92)
	LP	1,11c ($\pm$ 0,87)	1,17c ($\pm$ 0,87)	1,18c ($\pm$ 0,89)
T 5	SN	0,71aA ($\pm$ 0,30)	0,63aA ($\pm$ 0,35)	0,68aA ($\pm$ 0,37)
	AL	0,70aA ($\pm$ 0,07)	0,75aA ($\pm$ 0,06)	0,73aA ($\pm$ 0,09)
	LP	0,24aB ($\pm$ 0,30)	0,24aB ($\pm$ 0,29)	0,25aB ($\pm$ 0,31)
T 6	SN	0,49bA ($\pm$ 0,12)	0,50b ($\pm$ 0,13)	0,51b ($\pm$ 0,16)
	AL	0,46aA ($\pm$ 0,22)	0,41a ($\pm$ 0,29)	0,46a ($\pm$ 0,29)
	LP	0,28aB ($\pm$ 0,25)	0,37a ($\pm$ 0,24)	0,38a ($\pm$ 0,24)
T 7	SN	0,40b ($\pm$ 0,26)	0,39b ($\pm$ 0,24)	0,44b ($\pm$ 0,27)
	AL	0,46a ($\pm$ 0,41)	0,47a ($\pm$ 0,40)	0,49a ($\pm$ 0,42)
	LP	0,37a ($\pm$ 0,35)	0,37a ($\pm$ 0,36)	0,36a ($\pm$ 0,38)

¹ **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo LP:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio. **Con-A:** concanavalina-A; **LPS:** lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*. Resultados com letras maiúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p \leq 0,01$, em um mesmo tempo de coleta. Resultados com letras minúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p < 0,01$, entre os tempos de coleta.

*: diferença com $p = 0,021$, em função do estímulo *in vitro*, em um mesmo tempo de coleta.

Observou-se que, com uma única exceção, não houve diferença nos índices médios de proliferação de linfócitos em função da presença e do tipo de estímulo *in vitro*, a cada coleta, tanto entre amostras obtidas de animais pertencentes a cada grupo experimental, quanto ao se avaliar as médias dos valores observados nos 30 animais. Excetuou-se o índice de proliferação verificado em células obtidas com animais com LP, 17 dias após o desafio antigênico, em que o índice basal foi menor ($p=0,021$) que aquele observado após os estímulos *in vitro*.

Por sua vez, analisando-se cada tempo de coleta, verificou-se que, antes do desafio antigênico (T0), os índices médios de proliferação dos linfócitos obtidos de animais manifestando LP foi menor que aquele observado em células obtidas dos animais pertencentes aos demais grupos, tanto sem prévio estímulo *in vitro* ($p=0,003$), quanto após estímulo com Con-A ($p=0,01$) ou com LPS ($p=0,008$).

Tal resultado foi semelhante 31 dias após o desafio antigênico (T5), novamente tanto sem prévio estímulo *in vitro* ($p<0,001$), quanto após estímulo com Con-A ($p=0,005$) ou com LPS ($p=0,008$).

No entanto, este menor índice de proliferação em amostras obtidas de animais manifestando LP foi observado, 38 dias após o desafio antigênico (T6), apenas nas células às quais não foi previamente adicionado estímulo *in vitro* ($p=0,01$).

Por outro lado, 17 dias após o desafio antigênico (T3), verificou-se índice de proliferação em linfócitos obtidos de animais manifestando LP maior que aquele observado em células obtidas dos animais pertencentes aos demais grupos, mas apenas após estímulo *in vitro* com Con-A ($p=0,008$) ou com LPS ($p=0,007$).

Os índices médios ($\pm$ desvio padrão) de proliferação de linfócitos, em função da presença e do tipo de estímulo *in vitro*, observados nos 30 animais selecionados, a cada tempo de coleta, são apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Índices médios ($\pm$ desvio padrão) de proliferação de linfócitos, com e sem estímulo *in vitro*, observados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Basal (sem estímulo)	Estímulo <i>in vitro</i>	
		Con-A	LPS
T 0	0,60 ($\pm$ 0,61)a	0,62 ($\pm$ 0,62)a	0,60 ($\pm$ 0,60)a
T 1	0,75 ($\pm$ 0,27)a	0,71 ($\pm$ 0,33)a	0,71 ($\pm$ 0,29)a
T 2	0,60 ($\pm$ 0,40)a	0,57 ($\pm$ 0,42)a	0,61 ($\pm$ 0,43)a
T 3	0,61 ($\pm$ 0,33)a	0,67 ($\pm$ 0,44)a	0,65 ($\pm$ 0,43)a
T 4	1,07 ($\pm$ 0,80)b	1,12 ($\pm$ 0,79)b	1,11 ($\pm$ 0,83)b
T 5	0,56 ($\pm$ 0,32)a	0,56 ($\pm$ 0,33)a	0,57 ($\pm$ 0,34)a
T 6	0,41 ($\pm$ 0,22)a	0,43 ($\pm$ 0,23)a	0,45 ($\pm$ 0,23)a
T 7	0,41 ($\pm$ 0,32)a	0,41 ($\pm$ 0,32)a	0,44 ($\pm$ 0,34)a

¹ T 0: quatro dias antes do desafio antigênico; T 1: três; T 2: dez; T 3: 17; T 4: 24; T 5: 31; T 6: 38; e T 7: 45 dias após o desafio. Con-A: concanavalina-A; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*. Resultados com letras divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p < 0,01$, entre os tempos de coleta.

Analisando-se a média dos índices verificados em linfócitos obtidos de todos os 30 animais, ao longo do período de coletas, observou-se que elas foram maiores 24 dias após o desafio antigênico (T4), tanto sem prévio estímulo *in vitro* ($p=0,004$), quanto após estímulo com Con-A ($p=0,008$) ou com LPS ($p=0,005$).

Ao se considerar cada grupo experimental, observou-se que o índice de proliferação em linfócitos obtidos de animais não infectados (grupo SN) diminuiu 17 dias após o desafio antigênico (T3), atingiu seu maior valor 24 dias após o desafio (T4), retornou a valores similares aos de antes do desafio (T0) 31 dias após o mesmo (T5) e alcançou valores inferiores àqueles verificados antes do desafio, 38 dias após o mesmo (T6 e T7).

Tal comportamento foi notado tanto sem prévio estímulo *in vitro* ($p=0,008$), quanto após estímulo com Con-A ($p=0,007$) ou com LPS ($p=0,009$).

Contemplando-se apenas os índices observados em células obtidas de animais infectados alinfocitóticos (grupo AL), verificou-se que houve um aumento 24 dias após o desafio antigênico (T4), novamente tanto sem prévio estímulo *in vitro* ($p=0,003$), quanto após estímulo com Con-A ($p=0,004$) ou com LPS ($p<0,001$).

Passando-se a ponderar os índices de proliferação de linfócitos obtidos de animais manifestando LP (grupo LP), notou-se que eles aumentaram logo três dias após o desafio antigênico (T1), também atingindo seu maior valor 24 dias após o desafio (T4) e retornando a

valores semelhantes àqueles observados antes do desafio (T0) 31 dias após o mesmo (T5), também tanto sem prévio estímulo *in vitro* ($p<0,001$), quanto após estímulo com Con-A ($p=0,001$) ou com LPS ($p<0,001$).

Para uma melhor visualização, os índices de proliferação de linfócitos, segundo o estímulo *in vitro*, verificados nos 30 animais selecionados, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 24.

¹ T 0: quatro dias antes do desafio antigênico; T 1: três; T 2: dez; T 3: 17; T 4: 24; T 5: 31; T 6: 38; e T 7: 45 dias após o desafio. Con-A: concanavalina-A; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*.

**: diferença com $p<0,01$, ao longo dos tempos de coleta, para cada estímulo *in vitro*.

Figura 24 – Índices médios de proliferação de linfócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do estímulo *in vitro*, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Do mesmo modo, os índices de proliferação de linfócitos, segundo o estímulo *in vitro*, observados apenas nos 10 animais pertencentes ao grupo SN, a cada tempo de coleta, são apresentados na figura 25.

¹ T 0: quatro dias antes do desafio antigênico; T 1: três; T 2: dez; T 3: 17; T 4: 24; T 5: 31; T 6: 38; e T 7: 45 dias após o desafio. **Con-A:** concanavalina-A; **LPS:** lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*.

** : diferença com $p < 0,01$, ao longo dos tempos de coleta, para cada estímulo *in vitro*.

Figura 25 – Índices médios de proliferação de linfócitos obtidos de 10 vacas da raça Holandês Preto e Branco soronegativas para a Leucose Enzoótica Bovina (grupo SN), em função do estímulo *in vitro*, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Os índices de proliferação de linfócitos, segundo o estímulo *in vitro*, observados apenas nos 10 animais pertencentes ao grupo AL, a cada tempo de coleta, são apresentados na figura 26.

¹ T 0: quatro dias antes do desafio antigênico; T 1: três; T 2: dez; T 3: 17; T 4: 24; T 5: 31; T 6: 38; e T 7: 45 dias após o desafio. **Con-A:** concanavalina-A; **LPS:** lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*.

** : diferença com $p < 0,01$, ao longo dos tempos de coleta, para cada estímulo *in vitro*.

Figura 26 – Índices médios de proliferação de linfócitos obtidos de 10 vacas da raça Holandês Preto e Branco positivas para a Leucose Enzoótica Bovina, não manifestando linfocitose persistente (grupo AL), em função do estímulo *in vitro*, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Também, os índices de proliferação de linfócitos, segundo o estímulo *in vitro*, observados apenas nos 10 animais pertencentes ao grupo LP, a cada tempo de coleta, são apresentados na figura 27.

¹ T 0: quatro dias antes do desafio antigênico; T 1: três; T 2: dez; T 3: 17; T 4: 24; T 5: 31; T 6: 38; e T 7: 45 dias após o desafio. Con-A: concanavalina-A; LPS: lipopolissacarídeos de *Escherichia coli*.

*: diferença com $p=0,021$, em função do estímulo *in vitro*, em um mesmo tempo de coleta.

**: diferença com $p<0,01$, ao longo dos tempos de coleta, para cada estímulo *in vitro*.

Figura 27 – Índices médios de proliferação de linfócitos obtidos de 10 vacas da raça Holandês Preto e Branco positivas para a Leucose Enzoótica Bovina, manifestando linfocitose persistente (grupo LP), em função do estímulo *in vitro*, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Novamente, para uma melhor visualização do comportamento dos dados ao longo dos tempos de coleta, os índices basais de proliferação de linfócitos obtidos dos 30 animais selecionados, separados em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 28.

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

*: diferença com $p \leq 0,01$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

**: diferença com $p < 0,01$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 28 – Índices basais de proliferação de linfócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Também, os índices de proliferação, após estímulo *in vitro* com a adição de Con-A, de linfócitos obtidos dos 30 animais selecionados, separados em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 29.

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

*: diferença com $p \leq 0,01$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p < 0,01$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 29 – Índices de proliferação, após estímulo *in vitro* com concanavalina-A, de linfócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

E, por fim, os índices de proliferação, após estímulo *in vitro* com a adição de LPS, de linfócitos obtidos dos 30 animais selecionados, separados em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 30.

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

*: diferença com $p \leq 0,01$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

**: diferença com $p < 0,01$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 30 – Índices de proliferação, após estímulo *in vitro* com lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS), de linfócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em relação ao grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

5.3 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR

As porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de células sofrendo processo de apoptose ou de necrose observadas nas amostras sanguíneas dos animais de cada grupo experimental, a cada tempo de coleta, são apresentadas na tabela 8.

Tabela 8 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de leucócitos em processo de apoptose ou em processo de necrose, observadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Grupo	Apoptose	Necrose
T 0	SN	5,57% ($\pm$ 0,99) A	26,42% ($\pm$ 6,57) a
	AL	5,09% ($\pm$ 1,72) A	24,67% ($\pm$ 4,34) a
	LP	1,70% ($\pm$ 0,81) aB	26,79% ($\pm$ 3,30) a
T 1	SN	6,32% ($\pm$ 1,21) A	35,00% ($\pm$ 6,52) ab
	AL	6,62% ($\pm$ 0,92) A	27,82% ($\pm$ 5,56) a
	LP	0,48% ($\pm$ 0,15) bB	38,67% ($\pm$ 8,79) b
T 2	SN	4,89% ($\pm$ 1,08) A	38,70% ($\pm$ 8,91) ab
	AL	5,18% ($\pm$ 0,54) A	42,60% ($\pm$ 9,51) b
	LP	1,22% ($\pm$ 0,18) aB	42,58% ($\pm$ 6,66) b
T 3	SN	4,46% ($\pm$ 0,22) A	24,78% ($\pm$ 5,49) a
	AL	4,25% ($\pm$ 1,21) A	19,28% ($\pm$ 5,08) a
	LP	1,27% ($\pm$ 0,61) aB	15,07% ($\pm$ 4,75) c
T 4	SN	5,72% ($\pm$ 0,88) A	32,74% ($\pm$ 7,75) ab
	AL	6,14% ($\pm$ 0,54) A	20,92% ($\pm$ 4,53) a
	LP	1,51% ($\pm$ 0,33) aB	39,55% ($\pm$ 9,69) b
T 5	SN	4,40% ($\pm$ 0,55) A	40,25% ($\pm$ 7,93) b
	AL	4,67% ($\pm$ 0,52) A	31,06% ($\pm$ 9,25) ab
	LP	1,51% ($\pm$ 0,58) aB	30,74% ($\pm$ 8,16) ab
T 6	SN	4,24% ($\pm$ 0,47) A	15,92% ($\pm$ 9,76) c
	AL	4,74% ($\pm$ 0,53) A	18,83% ($\pm$ 6,59) a
	LP	1,55% ($\pm$ 0,57) aB	13,80% ($\pm$ 7,32) c
T 7	SN	4,07% ($\pm$ 0,03) A	26,43% ($\pm$ 6,93) a
	AL	4,10% ($\pm$ 0,06) A	28,40% ($\pm$ 5,79) ab
	LP	1,50% ($\pm$ 0,37) aB	26,02% ($\pm$ 7,96) a

¹ **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo LP:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio. Resultados com letras maiúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p \leq 0,001$, em um mesmo tempo de coleta. Resultados com letras minúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p \leq 0,01$, entre os tempos de coleta.

Já as porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de células sofrendo processo de apoptose ou de necrose verificadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais, a cada tempo de coleta, são apresentadas na tabela 9.

Tabela 9 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de leucócitos em processo de apoptose ou em processo de necrose, observadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Apoptose	Necrose
T 0	4,34% ($\pm$ 2,06)	25,82% ($\pm$ 4,73) a
T 1	4,88% ($\pm$ 1,92)	33,10% ($\pm$ 7,25) ab
T 2	4,03% ($\pm$ 1,88)	41,30% ($\pm$ 8,25) b
T 3	3,52% ($\pm$ 1,40)	19,99% ($\pm$ 5,77) c
T 4	4,76% ($\pm$ 0,74)	29,83% ($\pm$ 7,63) a
T 5	3,74% ($\pm$ 0,79)	34,04% ($\pm$ 8,98) ab
T 6	3,72% ($\pm$ 0,86)	16,51% ($\pm$ 7,67) c
T 7	3,40% ($\pm$ 0,20)	27,11% ($\pm$ 6,36) a

¹ **T 0**: quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1**: três; **T 2**: dez; **T 3**: 17; **T 4**: 24; **T 5**: 31; **T 6**: 38; e **T 7**: 45 dias após o desafio. Resultados com letras divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p \leq 0,01$, entre os tempos de coleta.

Foi verificado que não houve diferença nas porcentagens médias de células sofrendo processo de apoptose, ao longo do período de coletas, quando foram avaliadas as células obtidas das amostras sangüíneas dos 30 animais, bem como quando analisadas as amostras obtidas de animais pertencentes aos grupos SN e AL separadamente.

Entretanto, observou-se que houve uma diminuição ($p=0,006$) na porcentagem de células sofrendo apoptose três dias após o desafio antigênico (T1), quando foram avaliadas apenas as células obtidas de animais pertencentes ao grupo LP.

Por sua vez, notou-se também que, em todos os tempos de coleta, as porcentagens médias de leucócitos sofrendo processo de apoptose foram menores entre as células obtidas de animais manifestando LP ($p \leq 0,001$).

Analisando-se as porcentagens médias de células em processo de necrose, verificou-se que não houve diferenças, a cada tempo de coleta, em função do grupo experimental.

Todavia, ao longo do período de coletas, notou-se que tais porcentagens médias oscilaram.

Quando foram avaliados os leucócitos obtidos das amostras sangüíneas dos 30 animais, observou-se que houve um aumento na porcentagem de células sofrendo necrose, três dias após o desafio antigênico (T1), atingindo seu valor máximo dez dias após o desafio (T2). Tais médias começaram a diminuir 17 dias após o desafio antigênico (T3), atingindo seu valor mínimo 38 dias após o desafio (T6) e retornando aos valores de antes do mesmo (T0), 45 dias após o desafio (T7) ($p=0,013$).

Observando-se cada grupo experimental individualmente, verificou-se que a porcentagem de células sofrendo necrose em leucócitos obtidos de animais não infectados (grupo SN) atingiu seu maior valor 31 dias após o desafio (T5) e alcançou valores inferiores

àqueles verificados antes do desafio (T0), 38 dias após o mesmo (T6), retornando a valores semelhantes aos de antes do desafio 45 dias após o mesmo (T7) ($p=0,022$).

Notou-se menor variação na porcentagem de células sofrendo necrose em leucócitos obtidos de animais infectados alinfocitóticos (grupo AL). As médias atingiram seu maior valor dez dias após o desafio (T2), retornando a valores semelhantes aos de antes do desafio 17 dias após o mesmo (T3) ($p=0,009$).

Por sua vez, observou-se que a porcentagem de células sofrendo necrose em leucócitos obtidos de animais manifestando LP (grupo LP) atingiu seu maior valor já 10 dias após o desafio antigênico (T2), mas alcançou valores inferiores àqueles verificados antes do desafio (T0), 17 dias após o mesmo (T3). Tal porcentagem voltou a atingir valores superiores aos de antes do desafio, 24 dias após o mesmo (T4), alcançou novamente valores inferiores àqueles verificados antes do desafio, 38 dias após o mesmo (T6) retornando a valores semelhantes aos de antes do desafio 45 dias após o mesmo (T7) ($p=0,031$).

As porcentagens de células em processo de apoptose e em processo de necrose, verificadas nos 30 animais selecionados, a cada tempo de coleta, também são apresentadas na figura 31.

¹ T 0: quatro dias antes do desafio antigênico; T 1: três; T 2: dez; T 3: 17; T 4: 24; T 5: 31; T 6: 38; e T 7: 45 dias após o desafio.

** : diferença com $p \leq 0,01$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo parâmetro.

Figura 31 – Porcentagens médias células em processo de apoptose e de necrose verificadas em leucócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta¹
– São Paulo – 2010

Da mesma forma, as porcentagens de células em processo de apoptose verificadas em amostras obtidas dos 30 animais selecionados, separados em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, são apresentados na figura 32.

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

*: diferença com $p \leq 0,001$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p \leq 0,01$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 32 – Porcentagens médias células em processo de apoptose verificadas em leucócitos obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

5.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

As concentrações séricas das citocinas IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α foram quantificadas em duplicata, a cada tempo de coleta, por ELISA, empregando-se Kits comerciais. Os resultados médios ($\pm$ desvio padrão) observados em cada grupo experimental são apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) das quantidades de IL-12, IFN- γ , IL-10 e TNF- α séricas (pg/mL) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Grupo	IL-12	IFN- γ	IL-10	TNF- α
T 0	SN	1,80aA ($\pm$ 1,25)	4,38aA ($\pm$ 2,57)	63,18aA ($\pm$ 54,61)	21,96aA ($\pm$ 21,04)
	AL	8,37aB ($\pm$ 6,73)	7,71aB ($\pm$ 3,65)	59,46aA ($\pm$ 53,36)	20,47aA ($\pm$ 20,65)
	LP	1,88aA ($\pm$ 1,92)	4,08aA ($\pm$ 2,45)	139,31aB ($\pm$ 107,17)	71,10aB ($\pm$ 50,43)
T 1	SN	1,88aA ($\pm$ 1,12)	24,03b ($\pm$ 19,79)	478,38b ($\pm$ 476,31)	86,96b ($\pm$ 94,48)
	AL	8,45aB ($\pm$ 6,49)	25,24b ($\pm$ 23,35)	486,65b ($\pm$ 534,66)	88,79b ($\pm$ 114,00)
	LP	1,77aA ($\pm$ 0,73)	25,74b ($\pm$ 20,39)	483,62b ($\pm$ 448,47)	85,20a ($\pm$ 75,16)
T 2	SN	191,91b ($\pm$ 202,56)	33,95c ($\pm$ 30,39)	218,64c ($\pm$ 203,11)	52,39cA ($\pm$ 52,81)
	AL	186,16b ($\pm$ 210,34)	34,58c ($\pm$ 33,30)	219,12c ($\pm$ 222,80)	56,69cA ($\pm$ 68,76)
	LP	189,68b ($\pm$ 202,62)	34,95c ($\pm$ 29,86)	228,22c ($\pm$ 197,21)	84,49aB ($\pm$ 69,68)
T 3	SN	1,96aA ($\pm$ 1,69)	3,14aA ($\pm$ 2,52)	224,79c ($\pm$ 220,72)	22,08aA ($\pm$ 20,90)
	AL	8,91aB ($\pm$ 6,95)	6,70aB ($\pm$ 3,00)	227,91c ($\pm$ 247,23)	20,60aA ($\pm$ 20,96)
	LP	1,97aA ($\pm$ 1,23)	3,90aA ($\pm$ 2,44)	228,84c ($\pm$ 196,00)	73,81aB ($\pm$ 51,46)
T 4	SN	1,80aA ($\pm$ 0,71)	4,00aA ($\pm$ 2,53)	212,11c ($\pm$ 212,02)	22,02aA ($\pm$ 20,88)
	AL	9,31aB ($\pm$ 6,89)	7,31aB ($\pm$ 3,25)	212,75c ($\pm$ 233,49)	20,45aA ($\pm$ 20,94)
	LP	1,83aA ($\pm$ 0,56)	3,46aA ($\pm$ 1,93)	217,51c ($\pm$ 200,60)	72,67aB ($\pm$ 50,74)
T 5	SN	1,87aA ($\pm$ 1,70)	3,85aA ($\pm$ 2,49)	461,20b ($\pm$ 474,63)	22,06aA ($\pm$ 20,95)
	AL	8,57aB ($\pm$ 7,27)	7,19aB ($\pm$ 4,09)	458,08b ($\pm$ 524,76)	20,32aA ($\pm$ 20,84)
	LP	1,89aA ($\pm$ 1,81)	2,92aA ($\pm$ 2,04)	450,36b ($\pm$ 459,21)	71,41aB ($\pm$ 51,48)
T 6	SN	1,85aA ($\pm$ 1,47)	3,84aA ($\pm$ 2,29)	160,98d ($\pm$ 157,24)	22,22aA ($\pm$ 20,77)
	AL	8,94aB ($\pm$ 7,19)	7,44aB ($\pm$ 3,33)	166,21d ($\pm$ 182,94)	20,48aA ($\pm$ 21,35)
	LP	1,80aA ($\pm$ 1,23)	4,04aA ($\pm$ 2,20)	168,22a ($\pm$ 153,80)	70,71aB ($\pm$ 50,60)
T 7	SN	1,85aA ($\pm$ 1,41)	4,11aA ($\pm$ 2,73)	61,90aA ($\pm$ 50,87)	21,99aA ($\pm$ 21,25)
	AL	8,88aB ($\pm$ 6,70)	7,04aB ($\pm$ 3,24)	61,90aA ($\pm$ 53,67)	20,60aA ($\pm$ 20,76)
	LP	1,80aA ($\pm$ 0,52)	3,65aA ($\pm$ 1,96)	139,78aB ($\pm$ 103,93)	74,36aB ($\pm$ 51,03)

¹ IL: Interleucina; IFN: Interferon; TNF: Fator de Necrose Tumoral; **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo LP:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio. Resultados com letras maiúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p \leq 0,01$, em um mesmo tempo de coleta. Resultados com letras minúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p < 0,01$, entre os tempos de coleta.

Já os resultados médios ($\pm$ desvio padrão) das concentrações séricas das citocinas IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α verificados no sangue coletado dos 30 animais, a cada tempo de coleta, são apresentados na tabela 11.

Tabela 11 – Resultados médios ($\pm$ desvio padrão) das quantidades de IL-12, IFN- γ , IL-10 e TNF- α séricas (pg/mL) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	IL-12	IFN- γ	IL-10	TNF- α
T 0	4,23 ($\pm$ 5,23) a	5,51 ($\pm$ 3,35) a	84,66 ($\pm$ 80,01) a	36,16 ($\pm$ 39,09) a
T 1	4,25 ($\pm$ 5,06) a	24,99 ($\pm$ 20,61) b	482,98 ($\pm$ 473,79) b	87,10 ($\pm$ 93,87) b
T 2	189,13 ($\pm$ 198,30) b	34,48 ($\pm$ 30,25) c	221,69 ($\pm$ 201,66) c	63,60 ($\pm$ 63,51) c
T 3	4,51 ($\pm$ 5,43) a	4,73 ($\pm$ 3,07) a	227,15 ($\pm$ 216,33) c	37,06 ($\pm$ 40,21) a
T 4	4,56 ($\pm$ 5,49) a	5,05 ($\pm$ 3,12) a	213,96 ($\pm$ 209,42) c	36,64 ($\pm$ 39,66) a
T 5	4,33 ($\pm$ 5,55) a	4,79 ($\pm$ 3,53) a	456,80 ($\pm$ 472,29) b	36,23 ($\pm$ 39,58) a
T 6	4,44 ($\pm$ 5,57) a	5,22 ($\pm$ 3,12) a	165,07 ($\pm$ 160,41) d	36,13 ($\pm$ 39,09) a
T 7	4,41 ($\pm$ 5,30) a	5,05 ($\pm$ 3,07) a	83,86 ($\pm$ 78,51) a	37,19 ($\pm$ 40,25) a

¹ **IL:** Interleucina; **IFN:** Interferon; **TNF:** Fator de Necrose Tumoral; **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio. Resultados com letras divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p < 0,01$, entre os tempos de coleta.

Verificou-se que as concentrações séricas médias de IL-12 em amostras sangüíneas de animais pertencentes ao grupo AL, em todos os tempos de coleta, excetuando-se a coleta realizada dez dias após o desafio antigênico (T2), foram maiores ($p < 0,001$) que aquelas observadas nos animais pertencentes aos demais grupos experimentais.

Nesse tempo de coleta, dez dias após o desafio antigênico, houve um aumento nas médias das concentrações séricas de IL-12 em todos os grupos experimentais ($p < 0,001$), que retornaram a níveis semelhantes àqueles verificados antes do desafio, 17 dias após o mesmo (T3), permanecendo deste modo até a última coleta (T7).

De modo similar, observou-se que as concentrações séricas médias de IFN- γ em amostras sangüíneas de animais pertencentes ao grupo AL também foram maiores ($p = 0,008$) que aquelas observadas nos animais pertencentes aos demais grupos experimentais em todos os tempos de coleta, afora nas coletas realizadas três e dez dias após o desafio antigênico (T2 e T3).

Nesses dois tempos de coleta, aos três e aos dez dias após o desafio antigênico, verificou-se um aumento nas médias das concentrações séricas de IFN- γ em todos os grupos experimentais ($p = 0,005$). Tais concentrações também retornaram a valores similares àqueles verificados antes do desafio, 17 dias após o mesmo (T3), permanecendo deste modo até a última coleta (T7).

Por sua vez, as concentrações séricas médias de IL-10 em amostras sanguíneas de animais pertencentes ao grupo LP foram maiores ($p<0,001$) que aquelas observadas nos animais pertencentes aos demais grupos experimentais antes (T0) e 45 após o desafio antigênico (T7).

As concentrações séricas médias de IL-10 das amostras obtidas de todos os grupos experimentais aumentaram ($p<0,01$) após o desafio antigênico. Estas concentrações apresentaram seus valores máximos três (T1) e 31 (T5) dias após o desafio e retornaram a valores similares àqueles verificados antes do desafio apenas 45 dias após o mesmo (T7).

Verificou-se que as concentrações séricas médias de TNF- α , em amostras obtidas de animais pertencentes ao grupo LP também foram maiores ($p<0,001$) que aquelas observadas nos animais pertencentes aos demais grupos experimentais em todos os tempos de coleta, excetuando-se a coleta realizada três dias após o desafio antigênico (T1).

Observando-se as amostras obtidas nesse tempo de coleta (T1), verificou-se um aumento nas médias das concentrações de TNF- α no soro de animais pertencentes ao grupo SN ($p=0,007$) e no de animais pertencentes ao grupo AL ($p=0,004$). Tais concentrações também retornaram a valores similares àqueles verificados antes do desafio, 17 dias após o mesmo (T3), permanecendo deste modo até a última coleta (T7).

Para uma melhor observação de sua dinâmica ao longo dos tempos de coleta, as concentrações séricas das citocinas IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α verificadas nos 30 animais selecionados, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 33.

¹ T 0: quatro dias antes do desafio antigênico; T 1: três; T 2: dez; T 3: 17; T 4: 24; T 5: 31; T 6: 38; e T 7: 45 dias após o desafio. Letras divergentes nos resultados de IL-10 indicam diferença com $p < 0,01$, entre os tempos de coleta.

** : diferença com $p < 0,01$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados das concentrações séricas de uma mesma citocina.

Figura 33 – Concentrações séricas de Interleucina-10 (IL-10), IL-12, Interferon- γ (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) verificados em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Do mesmo modo, as concentrações séricas de IFN- γ verificadas nos 30 animais selecionados, separados em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 34.

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

*: diferença com $p \leq 0,01$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p < 0,01$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 34 – Concentrações séricas de Interferon- γ (IFN- γ) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

As concentrações séricas de IL-12 verificadas nos 30 animais selecionados, separados em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 35.

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

*: diferença com $p \leq 0,01$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p < 0,01$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 35 – Concentrações séricas de Interleucina-12 (IL-12) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

As concentrações séricas de TNF- α verificadas nos 30 animais selecionados, separados em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 36.

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

*: diferença com $p \leq 0,01$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p < 0,01$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 36 – Concentrações séricas de Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

E, por fim, as concentrações séricas de IL-10 verificadas nos 30 animais selecionados, separados em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentados na figura 37.

¹ **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo LP:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio. Letras divergentes indicam diferença com $p < 0,01$, entre os tempos de coleta.

*: diferença com $p \leq 0,01$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p < 0,01$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 37 – Concentrações séricas de Interleucina-10 (IL-10) verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

5.5 QUANTIFICAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS

As porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de leucócitos CD3(+), CD21(+), WC1(+), CD2(+) e CD14(+), observadas nas amostras sangüíneas de animais de cada grupo experimental, a cada tempo de coleta, são apresentadas na tabela 12.

Tabela 12 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de leucócitos CD3(+), CD21(+), WC1(+), CD2(+) e CD14(+), observadas no sangue periférico de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Grupo	Leucócitos				
		CD3(+)	CD21(+)	WC1(+)	CD2(+)	CD14(+)
T 0	SN	29,92% A ($\pm$ 7,84)	24,56% aaA ($\pm$ 6,33)	13,20% a ($\pm$ 4,55)	26,09% A ($\pm$ 4,73)	23,85% a ($\pm$ 6,28)
	AL	29,59% A ($\pm$ 4,25)	31,38% aaA ($\pm$ 4,25)	10,81% a ($\pm$ 6,91)	23,59% A ($\pm$ 5,45)	25,82% a ($\pm$ 6,40)
	LP	17,69% B ($\pm$ 4,91)	55,12% abB ($\pm$ 6,64)	17,73% a ($\pm$ 2,65)	10,69% B ($\pm$ 1,96)	29,08% a ($\pm$ 7,07)
T 1	SN	40,16% A ($\pm$ 9,29)	14,77% abA ($\pm$ 3,61)	5,23% bA ($\pm$ 1,55)	30,12% A ($\pm$ 5,91)	20,24% a ($\pm$ 8,89)
	AL	39,81% A ($\pm$ 9,78)	18,45% abA ($\pm$ 6,65)	8,52% aaAB ($\pm$ 2,92)	27,75% A ($\pm$ 5,27)	24,34% a ($\pm$ 7,58)
	LP	27,18% B ($\pm$ 8,82)	36,24% abB ($\pm$ 6,77)	11,56% abB ($\pm$ 4,47)	14,63% B ($\pm$ 4,81)	27,66% a ($\pm$ 8,29)
T 2	SN	35,35% A ($\pm$ 4,46)	20,51% aaA ($\pm$ 6,50)	4,84% bA ($\pm$ 3,63)	27,83% A ($\pm$ 5,13)	16,95% aaA ($\pm$ 9,33)
	AL	35,04% A ($\pm$ 8,29)	21,27% abA ($\pm$ 3,69)	5,53% bA ($\pm$ 2,60)	19,87% AB ($\pm$ 5,65)	26,84% aaB ($\pm$ 7,26)
	LP	22,90% B ($\pm$ 8,40)	49,91% abB ($\pm$ 5,21)	14,60% abB ($\pm$ 2,10)	16,93% B ($\pm$ 4,93)	28,94% aaB ($\pm$ 5,54)
T 3	SN	37,30% A ($\pm$ 8,51)	18,18% aaA ($\pm$ 6,66)	4,44% b ($\pm$ 1,28)	31,61% A ($\pm$ 6,42)	16,10% aaA ($\pm$ 6,50)
	AL	32,03% A ($\pm$ 7,78)	22,02% abA ($\pm$ 7,59)	5,75% b ($\pm$ 3,38)	28,03% A ($\pm$ 6,52)	25,93% aaB ($\pm$ 8,38)
	LP	17,64% B ($\pm$ 7,22)	39,83% abB ($\pm$ 8,10)	6,40% b ($\pm$ 3,62)	13,75% B ($\pm$ 3,51)	24,84% aaB ($\pm$ 8,33)
T 4	SN	41,03% A ($\pm$ 6,07)	15,62% abA ($\pm$ 4,40)	4,44% bA ($\pm$ 4,86)	28,17% A ($\pm$ 6,00)	35,70% b ($\pm$ 8,66)
	AL	35,34% A ($\pm$ 5,41)	15,47% abA ($\pm$ 5,80)	3,06% bA ($\pm$ 2,16)	28,33% A ($\pm$ 4,29)	32,86% b ($\pm$ 7,04)
	LP	22,90% B ($\pm$ 1,33)	39,10% abB ($\pm$ 2,79)	10,24% abB ($\pm$ 4,69)	12,71% B ($\pm$ 3,44)	42,65% b ($\pm$ 3,56)
T 5	SN	33,92% A ($\pm$ 6,20)	9,52% bA ($\pm$ 4,34)	6,53% bA ($\pm$ 2,10)	33,74% A ($\pm$ 5,37)	25,84% abA ($\pm$ 6,56)
	AL	36,40% A ($\pm$ 6,59)	13,63% abA ($\pm$ 3,52)	4,69% bA ($\pm$ 2,21)	29,02% A ($\pm$ 6,28)	29,54% abA ($\pm$ 5,22)
	LP	14,67% B ($\pm$ 4,11)	33,61% abB ($\pm$ 5,78)	16,76% abB ($\pm$ 3,82)	14,04% B ($\pm$ 5,06)	61,59% cB ($\pm$ 6,11)
T 6	SN	43,84% A ($\pm$ 4,84)	16,75% abA ($\pm$ 1,25)	9,41% abA ($\pm$ 5,11)	33,59% A ($\pm$ 6,67)	20,00% aaA ($\pm$ 5,84)
	AL	35,94% A ($\pm$ 6,86)	20,83% abA ($\pm$ 4,83)	9,93% aaA ($\pm$ 5,37)	27,23% A ($\pm$ 6,33)	30,14% abAB ($\pm$ 8,49)
	LP	23,51% B ($\pm$ 1,85)	32,08% abB ($\pm$ 2,97)	18,71% abB ($\pm$ 2,10)	12,92% B ($\pm$ 2,87)	39,77% abB ($\pm$ 7,40)
T 7	SN	31,67% A ($\pm$ 8,42)	25,28% aaA ($\pm$ 2,32)	7,73% abA ($\pm$ 4,21)	20,70% ($\pm$ 6,80)	20,18% a ($\pm$ 8,03)
	AL	29,98% A ($\pm$ 5,79)	22,83% abA ($\pm$ 4,76)	7,70% abA ($\pm$ 2,77)	18,94% ($\pm$ 7,75)	20,09% aa ($\pm$ 8,64)
	LP	25,02% B ($\pm$ 7,16)	43,57% abB ($\pm$ 4,87)	12,25% abB ($\pm$ 5,92)	17,14% ($\pm$ 5,40)	20,91% a ($\pm$ 7,55)

¹ **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo LP:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio. Resultados com letras maiúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p \leq 0,05$, em um mesmo tempo de coleta. Resultados com letras minúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p \leq 0,05$, entre os tempos de coleta.

Por sua vez, as porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de leucócitos CD3(+), CD21(+), WC1(+), CD2(+) e CD14(+), observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais, a cada tempo de coleta, são apresentadas na tabela 13.

Tabela 13 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de leucócitos CD3(+), CD21(+), WC1(+), CD2(+) e CD14(+), observadas no sangue periférico em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Leucócitos				
	CD3(+)	CD21(+)	WC1(+)	CD2(+)	CD14(+)
T 0	26,53% ($\pm$ 7,72)	35,44% a ($\pm$ 5,69)	13,45% a ($\pm$ 5,71)	20,98% ($\pm$ 4,77)	26,03% ($\pm$ 7,09)
T 1	36,56% ($\pm$ 9,44)	21,97% ab ($\pm$ 5,86)	8,23% ab ($\pm$ 3,05)	25,04% ($\pm$ 4,78)	23,86% ($\pm$ 8,29)
T 2	31,91% ($\pm$ 8,77)	28,65% a ($\pm$ 4,10)	7,72% b ($\pm$ 3,07)	21,74% ($\pm$ 4,90)	24,10% ($\pm$ 7,07)
T 3	29,95% ($\pm$ 8,62)	25,49% ab ($\pm$ 7,42)	5,49% b ($\pm$ 2,83)	25,42% ($\pm$ 5,68)	22,36% ($\pm$ 7,92)
T 4	33,92% ($\pm$ 4,98)	21,82% ab ($\pm$ 4,26)	5,43% b ($\pm$ 3,83)	24,11% ($\pm$ 4,83)	36,41% ($\pm$ 7,65)
T 5	29,78% ($\pm$ 5,34)	17,59% b ($\pm$ 4,56)	8,52% ab ($\pm$ 2,57)	26,60% ($\pm$ 6,05)	36,85% ($\pm$ 7,46)
T 6	35,26% ($\pm$ 4,54)	22,47% ab ($\pm$ 3,97)	12,10% a ($\pm$ 4,54)	25,53% ($\pm$ 5,36)	29,33% ($\pm$ 8,30)
T 7	29,22% ($\pm$ 8,52)	29,17% a ($\pm$ 3,83)	8,92% ab ($\pm$ 4,43)	19,04% ($\pm$ 6,47)	20,34% ($\pm$ 7,66)

¹ **T 0**: quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1**: três; **T 2**: dez; **T 3**: 17; **T 4**: 24; **T 5**: 31; **T 6**: 38; e **T 7**: 45 dias após o desafio. Resultados com letras divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p \leq 0,05$, entre os tempos de coleta.

Foi observado que as porcentagens médias da subpopulação de linfócitos T (leucócitos CD3⁺), em todos os tempos de coleta, foram menores ($p < 0,01$) nas amostras obtidas de animais manifestando LP do que nas obtidas dos animais pertencentes aos demais grupos experimentais.

Verificou-se que não houve diferença nas porcentagens médias desta subpopulação de linfócitos entre os tempos de coleta, tanto entre amostras obtidas de animais pertencentes a cada grupo experimental, quanto ao se avaliar as médias dos valores observados nos 30 animais.

Comportamento semelhante foi observado nas porcentagens médias da subpopulação de leucócitos CD2(+). No entanto, dez dias após o desafio antigênico (T2) não houve diferença relacionada a tal porcentagem entre os linfócitos obtidos de animais pertencentes ao grupo AL e aqueles obtidos de animais manifestando LP. Por sua vez, não houve diferença nas

porcentagens médias da subpopulação de leucócitos CD2(+) entre os três grupos experimentais, nas amostras coletadas 45 dias após o desafio (T7).

Verificou-se que as porcentagens médias da subpopulação de linfócitos B (leucócitos CD21⁺), em todos os tempos de coleta, foram maiores ($p < 0,001$) nas amostras obtidas de animais manifestando LP do que nas obtidas dos animais pertencentes aos demais grupos experimentais.

Ao se analisar o comportamento desta subpopulação ao longo dos tempos de coleta, observou-se que houve uma diminuição 31 dias após o desafio antigênico (T5), tanto quando avaliadas as 30 amostras ($p = 0,032$), quanto quando foram avaliadas as amostras por grupo experimental (grupo SN – $p = 0,012$; grupo AL – $p = 0,026$; grupo LP – $p = 0,009$). Salienta-se que tal diminuição fora observada, entre os leucócitos obtidos de animais pertencentes ao grupo AL, já 24 dias após o desafio (T4).

Observou-se que as porcentagens médias da subpopulação de linfócitos $\gamma\delta$ (leucócitos WC1⁺) foram maiores ($p < 0,01$) nas amostras obtidas de animais manifestando LP do que nas obtidas dos animais pertencentes aos demais grupos experimentais, em todos os tempos de coleta, excetuando-se a coleta ocorrida antes (T0) e 17 dias após (T3) o desafio antigênico. Destaca-se que, três dias após o desafio antigênico (T1), não houve diferença relacionada a tal porcentagem entre os linfócitos obtidos de animais pertencentes ao grupo AL e aqueles obtidos de animais manifestando LP.

Ao se analisar o comportamento da subpopulação de leucócitos WC1(+) ao longo dos tempos de coleta, observou-se que houve uma diminuição 17 dias após o desafio antigênico (T3), tanto quando avaliadas as 30 amostras ($p = 0,029$), quanto quando foram avaliadas as amostras por grupo experimental (grupo SN – $p = 0,007$; grupo AL – $p = 0,034$; grupo LP – $p = 0,01$). Por sua vez, ocorreu aumento na porcentagem média de linfócitos $\gamma\delta$ detectável, em animais do grupo LP, 24 dias após o desafio (T4) e, em amostras obtidas de animais pertencentes aos demais grupos experimentais, 31 dias após o desafio antigênico (T5).

Em dois dos tempos de coleta (T2 – $p = 0,011$; e T3 – $p = 0,013$), as porcentagens médias de monócitos (células CD14⁺) foram menores nas amostras obtidas de animais soronegativos do que naquelas dos animais pertencentes aos demais grupos. Por sua vez, em outros dois tempos de coleta (T5 – $p = 0,009$; e T6 – $p = 0,028$), as porcentagens médias de células CD14(+) foram maiores nas amostras obtidas de animais manifestando LP, do que naquelas dos animais pertencentes aos demais grupos.

Analisando-se a dinâmica desta subpopulação ao longo dos tempos de coleta, observou-se que houve um aumento 24 dias após o desafio antigênico (T4), quando foram avaliadas as

amostras por grupo experimental (grupo SN – $p=0,018$; grupo AL – $p=0,032$; grupo LP – $p=0,01$). Salienta-se que, entre os leucócitos obtidos de animais pertencentes ao grupo LP, tal aumento persistiu por mais tempo (até 38 dias após o desafio – T6) e alcançou seu valor máximo 31 dias após o desafio (T5).

Novamente, para uma melhor observação de sua dinâmica ao longo dos tempos de coleta, as porcentagens médias de linfócitos T (leucócitos CD3⁺) observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais selecionados, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentadas na figura 38.

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

*: diferença com $p \leq 0,05$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

Figura 38 – Porcentagens médias de leucócitos CD3(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Do mesmo modo, as porcentagens médias de linfócitos B (leucócitos CD21⁺) observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais selecionados, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentadas na figura 39.

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

*: diferença com $p \leq 0,05$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p \leq 0,05$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 39 – Porcentagens médias de leucócitos CD21(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

As porcentagens médias de leucócitos CD2(+) observadas nas amostras sangüíneas dos 30 animais selecionados, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentadas na figura 40.

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

*: diferença com $p \leq 0,05$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

Figura 40 – Porcentagens médias de leucócitos CD2(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

As porcentagens médias de linfócitos- $\gamma\delta$ (leucócitos WC1⁺) observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais selecionados, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentadas na figura 41.

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

*: diferença com $p \leq 0,05$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p \leq 0,05$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 41 – Porcentagens médias de leucócitos WC1(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

E as porcentagens médias de monócitos (leucócitos CD14⁺) observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais selecionados, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentadas na figura 42.

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

*: diferença com $p \leq 0,05$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p \leq 0,05$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 42 – Porcentagens médias de leucócitos CD14(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

5.5.1 Quantificação das subpopulações de linfócitos T

As porcentagens médias de leucócitos CD3(+) CD4(+) (linfócitos T auxiliares) e CD3(+) CD8(+) (linfócitos T citotóxicos), bem como as relações entre leucócitos CD3(+) CD4(+) e CD3(+) CD8(+), observadas nas amostras sanguíneas de animais de cada grupo experimental, a cada tempo de coleta, são apresentadas na tabela 14.

Tabela 14 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de linfócitos CD3(+) CD4(+) e CD3(+) CD8(+) e relações entre linfócitos CD3(+) CD4(+) e CD3(+) CD8(+), verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Grupo	Leucócitos CD3(+)		Relação CD4:CD8
		CD4(+)	CD8(+)	
T 0	SN	11,00% ($\pm$ 2,35) A	7,28% ($\pm$ 4,00) A	1,51 ($\pm$ 0,16) aA
	AL	9,79% ($\pm$ 2,00) A	7,82% ($\pm$ 2,62) A	1,25 ($\pm$ 0,15) aAB
	LP	3,90% ($\pm$ 0,71) B	3,69% ($\pm$ 0,91) B	1,06 ($\pm$ 0,21) aB
T 1	SN	13,42% ($\pm$ 3,23) A	9,57% ($\pm$ 3,02) A	1,40 ($\pm$ 0,31) aA
	AL	12,13% ($\pm$ 2,54) A	9,75% ($\pm$ 3,52) A	1,24 ($\pm$ 0,45) aAB
	LP	4,72% ($\pm$ 1,90) B	6,80% ($\pm$ 2,69) B	0,69 ($\pm$ 0,43) bB
T 2	SN	12,20% ($\pm$ 2,49) A	9,37% ($\pm$ 2,76) A	1,30 ($\pm$ 0,20) aA
	AL	11,40% ($\pm$ 3,57) A	9,96% ($\pm$ 3,30) A	1,14 ($\pm$ 0,21) aB
	LP	5,76% ($\pm$ 1,66) B	5,13% ($\pm$ 1,49) B	1,12 ($\pm$ 0,03) aB
T 3	SN	13,03% ($\pm$ 2,19) A	13,26% ($\pm$ 3,64) A	0,98 ($\pm$ 0,18) b
	AL	12,37% ($\pm$ 2,82) A	11,73% ($\pm$ 2,87) A	1,05 ($\pm$ 0,14) b
	LP	4,71% ($\pm$ 1,74) B	5,22% ($\pm$ 2,56) B	0,90 ($\pm$ 0,15) a
T 4	SN	14,53% ($\pm$ 4,62) A	8,26% ($\pm$ 3,86) A	1,76 ($\pm$ 0,15) aA
	AL	11,87% ($\pm$ 3,52) A	9,17% ($\pm$ 3,08) A	1,29 ($\pm$ 0,14) aB
	LP	5,39% ($\pm$ 1,25) B	3,20% ($\pm$ 1,32) B	1,69 ($\pm$ 0,08) cA
T 5	SN	14,21% ($\pm$ 4,44) A	7,24% ($\pm$ 1,86) A	1,96 ($\pm$ 0,13) cA
	AL	15,13% ($\pm$ 3,05) A	10,86% ($\pm$ 2,54) A	1,39 ($\pm$ 0,15) aB
	LP	5,67% ($\pm$ 0,58) B	4,62% ($\pm$ 1,28) B	1,23 ($\pm$ 0,15) aB
T 6	SN	14,75% ($\pm$ 4,57) A	10,35% ($\pm$ 3,87) A	1,42 ($\pm$ 0,19) aA
	AL	13,00% ($\pm$ 1,80) A	10,07% ($\pm$ 4,04) A	1,29 ($\pm$ 0,13) aAB
	LP	4,91% ($\pm$ 0,50) B	4,63% ($\pm$ 0,95) B	1,06 ($\pm$ 0,16) aB
T 7	SN	11,98% ($\pm$ 3,46) A	10,54% ($\pm$ 3,80) A	1,14 ($\pm$ 0,10) bA
	AL	10,66% ($\pm$ 1,91) A	11,15% ($\pm$ 3,64) A	0,96 ($\pm$ 0,06) bA
	LP	4,87% ($\pm$ 3,81) B	7,64% ($\pm$ 3,13) B	0,64 ($\pm$ 0,17) bB

¹ **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo LP:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio. Resultados com letras maiúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p \leq 0,01$, em um mesmo tempo de coleta. Resultados com letras minúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p \leq 0,05$, entre os tempos de coleta.

Por sua vez, as porcentagens médias de leucócitos CD3(+) CD4(+) (linfócitos T auxiliares) e CD3(+) CD8(+) (linfócitos T citotóxicos), assim como as relações entre estes leucócitos, observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais, a cada tempo de coleta, são apresentadas na tabela 15.

Tabela 15 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) de linfócitos CD3(+) CD4(+) e CD3(+) CD8(+) e relações entre linfócitos CD3(+) CD4(+) e CD3(+) CD8(+), verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Leucócitos CD3(+)		Relação CD4:CD8
	CD4(+)	CD8(+)	
T 0	8,62% ($\pm$ 3,48)	6,54% ($\pm$ 3,23)	1,32 ($\pm$ 0,28) a
T 1	10,58% ($\pm$ 3,45)	8,90% ($\pm$ 3,21)	1,19 ($\pm$ 0,42) a
T 2	10,16% ($\pm$ 3,82)	8,48% ($\pm$ 3,31)	1,20 ($\pm$ 0,28) a
T 3	10,55% ($\pm$ 3,27)	10,50% ($\pm$ 3,81)	1,00 ($\pm$ 0,17) b
T 4	11,03% ($\pm$ 3,31)	7,28% ($\pm$ 2,83)	1,52 ($\pm$ 0,10) a
T 5	12,30% ($\pm$ 3,40)	7,99% ($\pm$ 2,26)	1,54 ($\pm$ 0,15) a
T 6	11,43% ($\pm$ 3,93)	8,71% ($\pm$ 3,10)	1,31 ($\pm$ 0,19) a
T 7	9,55% ($\pm$ 3,02)	10,01% ($\pm$ 3,49)	0,95 ($\pm$ 0,11) b

¹ **T 0**: quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1**: três; **T 2**: dez; **T 3**: 17; **T 4**: 24; **T 5**: 31; **T 6**: 38; e **T 7**: 45 dias após o desafio. Resultados com letras divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p=0,05$, entre os tempos de coleta.

Verificou-se que não houve diferença nas porcentagens médias de leucócitos CD3(+) CD4(+), bem como de leucócitos CD3(+) CD8(+), entre os tempos de coleta, tanto entre amostras obtidas de animais pertencentes a cada grupo experimental, quanto ao se avaliar as médias dos valores observados nos 30 animais.

Todavia, foi observado que as porcentagens médias destas duas subpopulações de linfócitos T, em todos os tempos de coleta, foram menores ($p<0,01$) nas amostras obtidas de animais manifestando LP do que nas obtidas dos animais pertencentes aos demais grupos experimentais.

Observou-se que as médias das relações entre linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos, ao longo dos tempos de coleta, foram menores 17 dias (T3) e 45 dias (T7) após o desafio antigênico, tanto quando analisadas todas as 30 amostras ($p=0,05$), quanto ao se avaliar apenas as amostras obtidas de animais pertencentes ao grupo AL ($p=0,021$).

Observando-se apenas as amostras obtidas de animais manifestando LP, verificou-se que tal relação oscilou mais. Para este grupo, a média da relação foi menor três dias (T1) e 45 dias (T7) após o desafio, no entanto, foi maior 24 dias (T4) após o desafio ($p=0,019$). Avaliando-se apenas as amostras obtidas de animais soronegativos, observou-se que a média da relação entre linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos diminuiu três dias após o desafio (T1), retornou a um valor semelhante àquele verificado antes do desafio, 24 dias após o mesmo (T4), apresentou seu valor máximo 31 dias (T5) após o desafio e voltou a diminuir 45 dias

após o desafio (T7) ($p=0,038$).

Antes do desafio antigênico (T0), assim como três dias (T1) e 38 dias (T6) após o mesmo, as médias das relações entre linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos nas amostras obtidas de animais manifestando LP foram menores que aquelas verificadas em amostras de animais soronegativos ($p<0,01$). Elas foram, também, menores que as observadas em amostras de animais do grupo AL 45 dias (T7) após o desafio ($p<0,001$).

A média das relações entre linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos nas amostras obtidas de animais soronegativos foram maiores que aquelas verificadas nas amostras de animais pertencentes aos demais grupos, dez dias (T2) após o desafio ($p=0,009$) e 31 dias (T5) após o desafio antigênico ($p<0,001$).

Novamente, para uma observação mais acurada, as porcentagens médias de linfócitos T auxiliares (leucócitos $CD3^+ CD4^+$), observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais selecionados, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentadas na figura 43.

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

*: diferença com $p \leq 0,01$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

Figura 43 – Porcentagens médias de leucócitos $CD3^+ CD4^+$ obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

As porcentagens médias de linfócitos T citotóxicos (leucócitos CD3⁺ CD8⁺), observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais selecionados, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentadas na figura 44.

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

*: diferença com $p \leq 0,01$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

Figura 44 – Porcentagens médias de leucócitos CD3(+) CD8(+) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

E as relações médias entre linfócitos T auxiliares (leucócitos $CD3^+ CD4^+$) e linfócitos T citotóxicos (leucócitos $CD3^+ CD8^+$), observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais selecionados, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, são apresentadas na figura 45.

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

*: diferença com $p \leq 0,01$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

**: diferença com $p \leq 0,05$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 45 – Relações médias entre leucócitos $CD3(+) CD4(+)$ e $CD3(+) CD8(+)$, obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

5.5.2 Quantificação das subpopulações de linfócitos B

Por fim, as porcentagens médias das subpopulações de linfócitos B observadas nas amostras sanguíneas de animais de cada grupo experimental, a cada tempo de coleta, são apresentadas na tabela 16.

Tabela 16 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) das subpopulações de linfócitos B (CD21⁺), verificadas em 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, separadas em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Grupo	Leucócitos CD21(+)			
		Linfócitos B1a (CD5 ⁺ CD11b ⁺)	Linfócitos B1b (CD5 ⁺ CD11b ⁺)	Linfócitos B2 (CD5 ⁺ CD11b ⁻)	Linfócitos B CD5(+) CD11b(-)
T 0	SN	10,63% aA ($\pm$ 3,53)	8,51% aA ($\pm$ 3,29)	2,01% aA ($\pm$ 0,19)	3,41% aA ($\pm$ 0,42)
	AL	16,96% aA ($\pm$ 4,22)	7,04% aA ($\pm$ 3,79)	1,97% aA ($\pm$ 0,50)	5,42% aA ($\pm$ 0,88)
	LP	30,42% B ($\pm$ 7,02)	2,86% B ($\pm$ 0,95)	4,78% aB ($\pm$ 0,73)	17,06% aB ($\pm$ 4,41)
T 1	SN	3,66% bA ($\pm$ 0,57)	6,97% aA ($\pm$ 2,65)	2,10% aA ($\pm$ 0,55)	2,04% ab ($\pm$ 0,97)
	AL	6,34% bA ($\pm$ 1,85)	7,44% aA ($\pm$ 3,39)	2,03% aA ($\pm$ 0,68)	2,65% ab ($\pm$ 0,20)
	LP	28,40% B ($\pm$ 5,36)	3,64% B ($\pm$ 1,02)	1,37% bB ($\pm$ 0,46)	2,84% b ($\pm$ 0,08)
T 2	SN	6,64% abA ($\pm$ 1,65)	6,24% abA ($\pm$ 2,77)	3,56% b ($\pm$ 0,20)	4,06% aA ($\pm$ 1,12)
	AL	7,25% bA ($\pm$ 1,88)	6,97% aA ($\pm$ 1,84)	3,21% b ($\pm$ 0,83)	3,84% aA ($\pm$ 0,97)
	LP	26,82% B ($\pm$ 4,85)	4,62% B ($\pm$ 1,32)	2,61% b ($\pm$ 0,88)	15,87% aB ($\pm$ 3,57)
T 3	SN	4,57% bA ($\pm$ 1,03)	8,98% aA ($\pm$ 3,17)	2,65% abA ($\pm$ 0,72)	1,98% abA ($\pm$ 0,32)
	AL	6,19% bA ($\pm$ 1,66)	11,76% bA ($\pm$ 4,57)	2,08% aAB ($\pm$ 0,24)	1,99% abA ($\pm$ 0,46)
	LP	29,11% B ($\pm$ 5,04)	4,17% B ($\pm$ 1,55)	1,63% bB ($\pm$ 0,55)	4,92% cB ($\pm$ 0,91)
T 4	SN	6,06% bA ($\pm$ 1,59)	6,29% abA ($\pm$ 2,47)	2,07% aA ($\pm$ 0,43)	1,21% b ($\pm$ 0,12)
	AL	8,54% bA ($\pm$ 1,99)	3,95% cB ($\pm$ 0,66)	1,80% aA ($\pm$ 0,45)	1,18% b ($\pm$ 0,25)
	LP	32,97% B ($\pm$ 6,70)	3,37% B ($\pm$ 0,83)	0,89% cB ($\pm$ 0,13)	1,88% b ($\pm$ 0,22)
T 5	SN	3,08% bA ($\pm$ 0,86)	4,13% b ($\pm$ 1,38)	1,21% cA ($\pm$ 0,21)	1,10% b ($\pm$ 0,08)
	AL	6,72% bA ($\pm$ 1,44)	4,40% c ($\pm$ 1,03)	1,29% cA ($\pm$ 0,17)	1,22% b ($\pm$ 0,09)
	LP	27,09% B ($\pm$ 4,75)	4,30% ($\pm$ 1,27)	0,74% cB ($\pm$ 0,07)	1,49% b ($\pm$ 0,11)
T 6	SN	5,07% bA ($\pm$ 1,18)	5,67% abA ($\pm$ 1,39)	1,10% cA ($\pm$ 0,06)	4,90% a ($\pm$ 1,04)
	AL	6,19% bA ($\pm$ 1,50)	5,91% acA ($\pm$ 1,62)	0,96% cA ($\pm$ 0,10)	7,77% a ($\pm$ 1,99)
	LP	20,95% B ($\pm$ 3,76)	2,43% B ($\pm$ 0,76)	2,04% bB ($\pm$ 0,32)	6,67% c ($\pm$ 2,03)
T 7	SN	13,22% aA ($\pm$ 3,88)	7,85% aA ($\pm$ 2,22)	2,04% aAB ($\pm$ 0,12)	2,17% abA ($\pm$ 1,34)
	AL	12,92% aA ($\pm$ 3,59)	5,04% cA ($\pm$ 1,98)	1,52% acA ($\pm$ 0,08)	3,35% abA ($\pm$ 1,20)
	LP	28,48% B ($\pm$ 5,22)	2,24% B ($\pm$ 0,52)	2,40% bB ($\pm$ 0,22)	10,45% acB ($\pm$ 3,57)

¹ **Grupo SN:** 10 vacas soronegativas para leucose enzoótica bovina; **Grupo AL:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, alinfocitóticas; **Grupo LP:** 10 vacas soropositivas para leucose enzoótica bovina, apresentando linfocitose persistente. **T 0:** quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1:** três; **T 2:** dez; **T 3:** 17; **T 4:** 24; **T 5:** 31; **T 6:** 38; e **T 7:** 45 dias após o desafio. Resultados com letras maiúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p < 0,05$, em um mesmo tempo de coleta. Resultados com letras minúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p < 0,05$, entre os tempos de coleta.

Por sua vez, as porcentagens médias das subpopulações de linfócitos B observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais selecionados, a cada tempo de coleta, são apresentadas na tabela 17.

Tabela 17 – Porcentagens médias ($\pm$ desvio padrão) das subpopulações de linfócitos B ($CD21^+$) no sangue periférico de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

Tempo	Leucócitos $CD21^+$			
	Linfócitos B1a ($CD5^+ CD11b^+$)	Linfócitos B1b ($CD5^- CD11b^+$)	Linfócitos B2 ($CD5^- CD11b^-$)	Linfócitos B $CD5^+ CD11b^-$
T 0	18,44% ($\pm 8,81$) a	6,41% ($\pm 2,17$) a	2,73% ($\pm 0,63$) a	7,85% ($\pm 2,89$) a
T 1	11,33% ($\pm 3,72$) b	6,27% ($\pm 2,32$) a	1,87% ($\pm 0,83$) ab	2,49% ($\pm 0,10$) b
T 2	12,27% ($\pm 3,73$) b	6,10% ($\pm 1,79$) a	3,16% ($\pm 0,72$) a	7,12% ($\pm 2,43$) a
T 3	11,76% ($\pm 3,82$) b	8,81% ($\pm 3,29$) b	2,15% ($\pm 0,74$) a	2,77% ($\pm 0,65$) b
T 4	14,23% ($\pm 4,29$) ab	4,57% ($\pm 1,58$) a	1,65% ($\pm 0,33$) ab	1,37% ($\pm 0,18$) b
T 5	10,94% ($\pm 3,11$) b	4,28% ($\pm 1,20$) a	1,12% ($\pm 0,11$) b	1,25% ($\pm 0,11$) c
T 6	9,75% ($\pm 3,01$) b	4,90% ($\pm 1,01$) a	1,30% ($\pm 0,09$) b	6,52% ($\pm 2,28$) a
T 7	17,17% ($\pm 3,17$) a	5,23% ($\pm 1,23$) a	1,93% ($\pm 0,61$) a	4,85% ($\pm 1,85$) a

¹ **T 0**: quatro dias antes do desafio antigênico; **T 1**: três; **T 2**: dez; **T 3**: 17; **T 4**: 24; **T 5**: 31; **T 6**: 38; e **T 7**: 45 dias após o desafio. Resultados com letras minúsculas divergentes em uma mesma coluna indicam diferença com $p < 0,05$, entre os tempos de coleta.

As porcentagens médias das subpopulações de linfócitos B1a (leucócitos $CD21^+$, $CD5^+$, $CD11b^+$) foram, em todos os tempos de coleta, maiores nas amostras obtidas de animais manifestando LP do que nas amostras dos animais pertencentes aos demais grupos ($p < 0,001$).

As porcentagens desta subpopulação de linfócitos B diminuíram três dias após o desafio antigênico (T1), retornando a valores similares àqueles de antes do desafio (T0), apenas 45 dias após o mesmo (T7), quando avaliadas as amostras dos 30 animais ($p = 0,039$), ou quando analisadas apenas as amostras obtidas de animais dos grupos SN ($p = 0,011$) ou do grupo AL ($p = 0,02$). Não houve diferença na dinâmica desta subpopulação ao longo do tempo, quando avaliadas apenas as amostras obtidas de animais manifestando LP.

Por sua vez, as porcentagens médias das subpopulações de linfócitos B1b (leucócitos $CD21^+$, $CD5^-$, $CD11b^+$) foram maiores nas amostras obtidas de animais manifestando LP do que nas amostras dos animais pertencentes aos demais grupos, antes do desafio antigênico (T0 – $p = 0,004$) e três dias (T1 – $p = 0,017$), dez dias (T2 – $p = 0,029$), 17 dias (T3 – $p = 0,009$), 38 dias (T6 – $p = 0,032$) e 45 dias após o desafio (T7 – $p = 0,041$). A porcentagem média desta subpopulação 24 dias após o desafio foi menor nas amostras obtidas de animais soronegativos do que naquelas obtidas de animais pertencentes aos demais grupos ($p = 0,006$). Não houve

diferença na porcentagem de linfócitos B1b, entre os grupos experimentais, 31 dias após o desafio.

As porcentagens desta subpopulação de linfócitos B aumentaram 17 dias após o desafio antigênico (T3), apresentando valores similares àqueles de antes do desafio (T0) nos demais tempos de coleta ($p=0,002$), quando avaliadas, em conjunto, as amostras dos 30 animais.

Quando analisadas apenas as amostras obtidas de animais do grupo SN, verificou-se que esta porcentagem diminuiu ($p=0,031$), 31 dias após o desafio (T5), apresentando valores semelhantes àqueles observados antes do desafio nos demais tempos de coleta.

Avaliando-se apenas as amostras obtidas de animais do grupo AL ($p=0,02$), foi observado que houve um aumento na porcentagem de linfócitos B1b, 17 dias após o desafio (T3), seguido de uma diminuição para valores inferiores aos verificados antes do desafio (T4 em diante).

Quando avaliadas apenas as amostras obtidas de animais manifestando LP, não houve diferença na dinâmica desta subpopulação ao longo do tempo.

As porcentagens médias das subpopulações de linfócitos B2 (leucócitos $CD21^+$, $CD5^-$, $CD11b^-$) foram maiores nas amostras obtidas de animais manifestando LP, do que nas amostras dos animais pertencentes aos demais grupos, antes do desafio antigênico (T0 – $p=0,022$) e 38 dias (T6 – $p=0,019$) após o mesmo.

Por sua vez, as porcentagens médias desta subpopulação foram menores nas amostras obtidas de animais manifestando LP, do que nas amostras dos animais pertencentes aos demais grupos, três dias (T1 – $p=0,018$), 24 dias (T4 – $p=0,008$) e 31 dias (T5 – $p=0,011$) após o desafio antigênico.

Nas amostras coletadas 17 dias após o desafio (T3), a porcentagem de linfócitos B2 em animais manifestando LP foi menor que aquela observada nas amostras de animais do grupo AL ($p=0,034$). No entanto, nas amostras coletadas 45 dias após o desafio (T7), a porcentagem desta subpopulação foi menor em animais pertencentes ao grupo AL do que aquela observada nas amostras dos animais manifestando LP ($p=0,038$).

Não houve diferença na porcentagem de linfócitos B2, entre os grupos experimentais, dez dias após o desafio (T2).

As porcentagens médias das subpopulações de linfócitos B $CD5(+)$ $CD11b(-)$ foram maiores nas amostras obtidas de animais manifestando LP do que nas amostras dos animais pertencentes aos demais grupos, antes do desafio antigênico (T0 – $p<0,001$) e dez dias (T2 – $p<0,001$), 17 dias (T3 – $p=0,003$) e 45 dias após o desafio (T7 – $p<0,001$). Não houve diferença, entre os grupos experimentais, nas porcentagens médias desta subpopulação nos

demais tempos de coleta.

As porcentagens desta subpopulação de linfócitos diminuíram três dias após o desafio antigênico (T1), retornaram a valores similares àqueles de antes do desafio (T0) dez dias após o mesmo (T2), diminuíram novamente 17 dias após o desafio (T3), alcançaram os menores valores 31 dias após o desafio (T5) e retornaram a valores semelhantes aos verificados antes do desafio, 38 dias após o mesmo, quando avaliadas, em conjunto, as amostras dos 30 animais ($p=0,033$).

Quando analisadas apenas as amostras obtidas de animais do grupo SN ($p=0,014$), ou aquelas obtidas de animais do grupo AL ($p=0,021$), verificou-se que esta porcentagem diminuiu, 24 dias após o desafio (T4), retornando à valores similares àqueles observados antes do desafio 38 dias após o mesmo (T6).

Avaliando-se apenas as amostras obtidas de animais manifestando LP ($p=0,031$), observou-se que tal porcentagem diminuiu três dias após o desafio (T1), retornou a valores semelhantes aos de antes do mesmo, dez dias após o desafio (T2), voltou a diminuir 17 dias após o mesmo (T3), alcançou seu menor valor 31 dias após o desafio (T5), voltando a alcançar valores semelhantes aos de antes do desafio, 45 dias após o mesmo.

As porcentagens médias de linfócitos B1a (leucócitos CD21⁺ CD5⁺ CD11b⁺), observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais selecionados, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentadas na figura 46.

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

*: diferença com $p < 0,05$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p < 0,05$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 46 – Porcentagens médias de linfócitos B1a (leucócitos CD21⁺ CD5⁺ CD11b⁺) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

As porcentagens médias de linfócitos B1b (leucócitos $CD21^+$ $CD5^-$ $CD11b^+$), observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais selecionados, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentadas na figura 47.

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

*: diferença com $p < 0,05$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p < 0,05$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 47 – Porcentagens médias de linfócitos B1b (leucócitos $CD21^+$ $CD5^-$ $CD11b^+$) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

As porcentagens médias de linfócitos B2 (leucócitos CD21⁺ CD5⁻ CD11b⁻), observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais selecionados, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentadas na figura 48.

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

*: diferença com $p < 0,05$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p < 0,05$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 48 – Porcentagens médias de linfócitos B2 (leucócitos CD21⁺ CD5⁻ CD11b⁻) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

As porcentagens médias de leucócitos CD21(+) CD5(+) CD11b(-), observadas nas amostras sanguíneas dos 30 animais selecionados, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta, também são apresentadas na figura 49.

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

*: diferença com $p < 0,05$, entre os grupos experimentais, em um mesmo tempo de coleta.

** : diferença com $p < 0,05$, ao longo dos tempos de coleta, nos resultados de um mesmo grupo experimental.

Figura 49 – Porcentagens médias de leucócitos CD21(+) CD5(+) CD11b(-) obtidos de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do grupo experimental, a cada tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

5.6 AVALIAÇÃO GLOBAL DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS

Para uma mais acurada ponderação global, a dinâmica de todas as variáveis avaliadas no presente estudo, em relação ao desafio antigênico, considerando-se as amostras sanguíneas obtidas dos 30 animais selecionados, são apresentadas, em conjunto, na figura 50.

Por sua vez, os valores observados nas amostras sanguíneas obtidas dos animais pertencentes ao Grupo SN, ao Grupo AL e ao Grupo LP são apresentadas, respectivamente, nas figuras 51, 52 e 53.

¹ T 0: quatro dias antes do desafio antigênico; T 1: três; T 2: dez; T 3: 17; T 4: 24; T 5: 31; T 6: 38; e T 7: 45 dias após o desafio.

** : diferença com $p < 0,05$, entre os tempos de coleta.

Figura 50 – Dinâmica das variáveis estudadas, em amostras sanguíneas obtidas de 30 vacas da raça Holandês Preto e Branco, em função do tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

¹ T 0: quatro dias antes do desafio antigênico; T 1: três; T 2: dez; T 3: 17; T 4: 24; T 5: 31; T 6: 38; e T 7: 45 dias após o desafio.

**: diferença com $p < 0,05$, entre os tempos de coleta.

Figura 51 – Dinâmica das variáveis estudadas, em amostras sanguíneas obtidas de 10 vacas da raça Holandês Preto e Branco, soronegativas para Leucose Enzoótica Bovina, em função do tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

¹ T 0: quatro dias antes do desafio antigênico; T 1: três; T 2: dez; T 3: 17; T 4: 24; T 5: 31; T 6: 38; e T 7: 45 dias após o desafio.

** : diferença com $p < 0,05$, entre os tempos de coleta.

Figura 52 – Dinâmica das variáveis estudadas, em amostras sanguíneas obtidas de 10 vacas da raça Holandês Preto e Branco, soropositivas para Leucose Enzoótica Bovina, sem linfocitose persistente, em função do tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

¹ T 0: quatro dias antes do desafio antigênico; T 1: três; T 2: dez; T 3: 17; T 4: 24; T 5: 31; T 6: 38; e T 7: 45 dias após o desafio.

**: diferença com $p < 0,05$, entre os tempos de coleta.

Figura 53 – Dinâmica das variáveis estudadas, em amostras sanguíneas obtidas de 10 vacas da raça Holandês Preto e Branco, soropositivas para Leucose Enzoótica Bovina, com linfocitose persistente, em função do tempo de coleta¹ – São Paulo – 2010

6 DISCUSSÃO

O presente estudo visou caracterizar aspectos da resposta imunológica de bovinos naturalmente infectados pelo VLB antes e após desafio antigênico mediante vacinação contra o vírus da febre aftosa.

Para tal, 274 fêmeas bovinas adultas em lactação, que não se encontravam no período periparto e não haviam sido tratadas com glicocorticóides nos prévios 30 dias, foram triadas. Destas fêmeas, 30 animais foram selecionados para a obtenção das amostras utilizadas para os ensaios propostos.

6.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Das fêmeas pesquisadas, 133 (48,54%) foram positivas no sorodiagnóstico, por IDAG, para LEB. Tal índice de ocorrência foi maior que aquele verificado por Olson et al. (1973), que observaram índices variando entre 24% e 42% em rebanhos leiteiros na Alemanha, ou aquele relatado por Lavanya et al. (2008), que afirmam que 30 a 40% das vacas adultas, nos Estados Unidos, estão infectadas por este retrovírus. Por sua vez, o índice verificado foi semelhante a alguns outros observados em diversos levantamentos sorodiagnósticos realizados em rebanhos leiteiros brasileiros, compilados por Lorenz e Straub (1987), nos quais os índices oscilaram entre 20,7% e 53,3%. Da mesma forma, acompanhou a média dos índices observados em vários outros levantamentos realizados posteriormente em território nacional (D'ANGELINO; GARCIA; BIRGEL, 1998; SIMÕES, 1998; MELO, 1999; CARNEIRO, 2000; BIRGEL JÚNIOR, 2001; SILVA, 2001; MEAS et al., 2002a; MATOS; BIRGEL JÚNIOR; BIRGEL, 2005; CAMARGOS et al., 2007).

Quando foi utilizado o ELISA, de maior sensibilidade, porém menor especificidade que a IDAG (CHOI; LIU; BUEHRING, 2002), verificou-se que 231 amostras (84,31%) obtiveram resultado positivo. Com o uso deste teste, a ocorrência de LEB nos rebanhos estudados assemelha-se à observada por Meirelles et al. (2009), de 81,1%. Todavia, o alto índice relatado por estes autores foi obtido utilizando-se de IDAG. Deve-se destacar que tal resultado foi verificado em rebanho leiteiro fechado, bem tecnificado e de alta produção, pertencente, no entanto, a uma universidade (e sujeito, assim, à intensa manipulação) onde,

segundo relato dos autores, não são tomadas medidas específicas de controle para LEB.

Para a seleção dos animais utilizados, foram considerados positivos no sorodiagnóstico para a LEB, os 133 animais diagnosticados como sororreagentes à IDAG, e foram considerados negativos, os 43 animais apresentando diagnóstico negativo no ELISA. Procurou-se evitar, deste modo, o emprego de animais falso-positivos e falso-negativos.

Por sua vez, o índice de animais apresentando LP observado no presente estudo (20,30% dos animais positivos e 9,85% do total) foi menor que aquele ressaltado por Parodi (1987), de 30 a 70% dos animais infectados. Porém, a extensa margem verificada nos dados compilados pelo autor reflete a diversidade de rebanhos estudados e, especialmente, de métodos empregados para a constatação de LP.

Em todos os tempos de coleta, os valores médios das contagens totais de leucócitos e absolutas de linfócitos foram maiores entre os animais manifestando LP, justificável pelo fato deste ser o critério de inclusão no grupo LP. Todavia, além disso, foi observado que, após o desafio antigênico, as quantidades médias de eritrócitos foram maiores, independente do grupo a que os animais pertenciam.

Não foram encontrados estudos avaliando a dinâmica eritrocitária em função de desafio antigênico. No entanto, tal resultado sugere que o estímulo vacinal pode, também, influenciar a eritropoiese, e demonstra que a infecção pelo VLB não altera tal influência.

6.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA HUMORAL

Linfócitos B são as únicas células do organismo que têm por função diferenciar-se e produzir anticorpos. Posto que o VLB apresenta, em bovinos infectados, principal tropismo por linfócitos B, diversos autores que procuram elucidar alterações imunitárias nestes animais avaliaram sua resposta humoral.

Tal avaliação pode ser realizada por meio da quantificação sérica de anticorpos específicos contra determinado antígeno ou, de maneira mais global, mensurando-se as concentrações séricas dos diferentes isotipos e subtipos de imunoglobulinas. De fato, a quantificação dos diferentes isotipos de anticorpos no soro por meio da Imunodifusão Radial Simples, largamente utilizada para a avaliação da transferência de imunidade passiva a neonatos (WEAVER et al., 2000), permite a mensuração de quantidades tão pequenas quanto 1 µg/mL (BUTLER, 1983). Além disso, auxilia no diagnóstico de alterações específicas na

produção dos diferentes isotipos ou subtipos, como ocorre, por exemplo, na deficiência seletiva de IgG2 (FRANCOZ et al., 2004).

No presente estudo, verificou-se que não houve diferença nas concentrações séricas médias de IgG1, de IgM e de IgA, tanto entre os tempos de coleta, quanto, a cada tempo, entre animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. Por outro lado, observou-se que as concentrações séricas médias de IgG2 aumentaram, após a vacinação, em todos os animais. Todavia, passados 17 dias do desafio antigênico, as concentrações séricas médias deste subtipo, em animais manifestando LP foram, a cada tempo de coleta, menores que aquelas verificadas nos animais pertencentes aos demais grupos experimentais.

No estudo de Heeney, Valli e Montesanti (1988), foi relatada uma menor concentração sérica de imunoglobulinas totais em bovinos infectados apresentando linfomas. No entanto, foi realizada uma comparação com bovinos que não apresentavam tumores, sem que houvesse sido verificada a presença de animais manifestando LP, entre aqueles que, infectados, não apresentavam a manifestação tumoral da enfermidade.

No posterior estudo de Gatei, Lavin e Daniel (1990), foi observada uma menor concentração sérica de IgM em animais apresentando LP, do que naqueles alinfocitóticos, bem como destes, em relação a animais soronegativos. Neste estudo, as concentrações séricas de IgG1 e de IgG2 não diferiram entre os grupos. Entretanto, o fato dos autores terem investigado bovinos pertencentes a diferentes raças, em diferentes rebanhos, pode explicar as diferenças em relação aos resultados verificados no presente estudo, posto que, nessa avaliação, os animais poderiam estar sujeitos a diferentes estímulos antigênicos.

Por sua vez, Birgel Júnior (2001) observou, em fêmeas bovinas de mesma raça e nacionalidade daquelas utilizadas para o presente estudo, que a concentração sérica de IgG e IgM dos animais soronegativos foi semelhante à encontrada nos animais reagentes com ou sem linfocitose. Todavia, tal estudo não caracterizou a persistência da linfocitose e não mensurou os diferentes subtipos de IgG.

Diferentes isotipos e subtipos de anticorpos divergem, estruturalmente, na sequência de aminoácidos que compõem as regiões constantes de suas cadeias pesadas e apresentam diferentes funções posto que estas são mediadas por meio da ligação destas regiões aos seus receptores nas diferentes populações celulares, assim como a diferentes proteínas, tais como aquelas que compõem o sistema complemento (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010).

O isotipo IgG é o mais abundante em respostas imunitárias secundárias e distribui-se igualmente entre os espaços intra e extravascular, enquanto anticorpos do isotipo IgM predominam nas respostas primárias e aqueles do isotipo IgA, embora presentes no soro,

predominam nas secreções e são os principais responsáveis pela resposta imunitária humoral em mucosas (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003). Os diferentes subtipos de IgG ligam-se aos receptores da superfície de fagócitos e promovem a fagocitose de partículas opsonizadas, já anticorpos do subtipo IgG1 (bem como do isotipo IgM) também ativam o sistema complemento, enquanto aqueles do subtipo IgG2 são menos eficientes nesta função (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010).

As médias das concentrações séricas de IgG2 e de IgM observadas neste estudo assemelharam-se àquelas relatadas por Butler (1983) de, respectivamente, 500 a 1350 mg/dL e 60 a 430 mg/dL. No entanto, as médias concentrações séricas de IgA aqui verificadas encontraram-se acima das 6 a 100 mg/dL relatadas pelo autor. Por outro lado, as médias das concentrações séricas de IgG1 observadas neste estudo foram inferiores àquelas relatadas por Butler (1983) de 600 a 1510 mg/dL.

As divergências aqui verificadas sugerem uma diversidade de agentes constantemente desafiando o sistema imunitário de bovinos submetidos a diferentes formas de criação, em regiões geográficas distintas. O levantamento realizado por Butler (1983), utilizado como referência, apresenta uma compilação dos resultados de outros 14 estudos que, *per se*, avaliaram as concentrações séricas de imunoglobulinas de 544 amostras de bovinos de idades, raças e condições sanitárias variadas, porém, em sua totalidade, criados no hemisfério Norte. Em vista das concentrações dos diferentes isotipos e subtipos observadas no presente estudo, supõe-se que os animais selecionados sejam mais constantemente desafiados por antígenos ingeridos ou inalados, deflagrando uma resposta humoral baseada na produção de IgA, em detrimento da produção de IgG.

Diversas imunodeficiências que envolvem, seletivamente, um ou mais isotipos ou subtipos de imunoglobulinas têm sido descritas em humanos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010), assim como em bovinos (FRANCOZ et al., 2004) e são decorrentes de diferenciação anormal de linfócitos B e, mais raramente, de alterações genéticas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010). Pessoas com deficiência de produção de IgA apresentam maior incidência de hipersensibilidade do tipo III (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003), enquanto indivíduos com deficiência de produção de IgG podem apresentar uma maior suscetibilidade a infecções bacterianas recorrentes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010).

Deste modo, uma avaliação mais acurada da resposta imunitária humoral deve contemplar a quantificação específica das concentrações sérica de diferentes isotipos, bem como dos diversos subtipos de imunoglobulinas.

Convém ressaltar que estudos também evidenciaram possíveis alterações funcionais em

imunoglobulinas de animais infectados pelo VLB (LEVKUT et al., 1995). Por exemplo, Teutsch e Lewin (1996) haviam observado uma expressão alterada no mRNA relacionado à transcrição de imunoglobulinas em linfócitos B de vacas infectadas pelo VLB com linfocitose em relação àqueles obtidos de bovinos com contagem linfocitária normal, infectados ou não.

Saini et al. (1999) observaram que as IgM de uma vaca infectada pelo VLB, com linfocitose, eram funcionais, exibindo reatividade poli-específica e contendo cadeias HCDR3 excepcionalmente longas. Segundo Yan et al. (2006), tais cadeias longas, que também são freqüentemente encontradas em pacientes humanos com severa leucemia linfocítica crônica de linfócitos B, caracteriza anticorpos direcionados para auto-antígenos carregados negativamente (por exemplo, DNA). No entanto, Zhao, Jackson e Aitken (2006) afirmaram que a presença destas cadeias longas é uma característica inerente à espécie bovina, à semelhança do que é observado em galinhas.

Da mesma forma, salienta-se que Garcia (1992), em seu estudo feito em rebanhos bovinos brasileiros, frente desafio semelhante ao utilizado no presente estudo, não observou alterações na produção de anticorpos contra o vírus da febre aftosa entre animais com sorodiagnóstico negativo e positivo sem linfocitose e com linfocitose moderada e acentuada.

Mais uma vez, nesses estudos, não foi caracterizada a persistência da linfocitose, fato que pode interferir na real formação dos grupos. No entanto, tais observações estimulam novas avaliações qualitativas relacionadas a imunoglobulinas produzidas por animais manifestando LP.

A primeira exposição a um antígeno (quer por infecção ou por vacinação) leva à ativação de linfócitos B inativos e sua diferenciação em plasmócitos e linfócitos B de memória nos órgãos linfóides e na medula óssea. Exposição subsequente ao mesmo antígeno (como caracterizado no presente estudo) induz a ativação dos linfócitos B de memória e uma resposta humoral com produção mais longa e mais intensa de anticorpos do isotipo IgG (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010), que perdura por períodos variáveis na dependência do antígeno (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003). Esta resposta secundária é regulada pelas IgGs produzidas, por meio de retroalimentação, inibindo a diferenciação dos linfócitos B (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010).

No presente estudo, constatou-se que a resposta humoral ao estímulo antigênico em bovinos que já haviam sido previamente imunizados com o mesmo antígeno (caracterizando, assim, uma resposta imunitária secundária ou adaptativa) fundamentou-se em uma maior produção de IgG2 detectável logo três dias após o desafio. Ainda, a concentração sérica deste isotipo alcançou pico detectável 17 dias após o desafio, estabilizando-se, em animais sem

LEB e nos infectados sem LP, até 38 dias pós-vacinação, quando retornou a valores semelhantes aos verificados antes do desafio.

Entretanto, animais com LP apresentaram resposta humoral menos intensa (caracterizada por concentrações de IgG2 menores durante o período de platô) e menos duradoura (visto que as concentrações séricas de IgG2 retornaram aos valores basais mais precocemente).

Assim, demonstrou-se que a resposta imunitária humoral secundária após vacinação contra o vírus da febre aftosa consiste na produção de IgG2 e observou-se que este tipo de resposta é menos eficaz em bovinos infectados pelo VLB, manifestando LP. Como a maior parte dos anticorpos dirigidos contra o polissacarídeo capsular de bactérias piogênicas pertence ao subtipo IgG2, independente da resposta vacinal, uma menor produção deste subtipo pode resultar em maior suscetibilidade, destes animais, a infecções piogênicas recorrentes.

6.3 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

A transmissão natural ou iatrogênica do VLB envolve, principalmente, a transferência de linfócitos sanguíneos infectados (HOPKINS; DIGIACOMO, 1997). No entanto, tanto na infecção natural, quanto na infecção experimental de bovinos ou ovinos, alguns dos processos que ocorrem após a infecção primária permanecem obscuros.

Por sua vez, a disponibilidade de duas espécies hospedeiras, ovinos e bovinos, em que um único agente, o VLB, induz uma doença semelhante, oferece uma oportunidade única para comparar diversos mecanismos envolvidos na patogenia. Talvez a principal peculiaridade seja o período de latência mais curto que antecede o início da doença em ovinos, em comparação aos bovinos. No entanto, algumas alterações observadas são diversas na infecção nas duas espécies (FLORINS et al., 2008).

Em infecções experimentais, um dos primeiros indícios de infecção é o aparecimento de uma resposta humoral antiviral em cerca de uma a oito semanas após a inoculação (RADKE; GROSSMAN; KIDD, 1990). Anticorpos reconhecendo epítomos estruturais (gp51, do envelope, e p24, do capsídeo) e proteínas reguladoras (Tax e Rex) são sintetizados em altos títulos. Alguns desses anticorpos atuam na lise direta de células produtoras de VLB (PORTETELLE et al., 1978) e o nível desta atividade citolítica mediada por anticorpos

aumenta com a progressão da doença (NAGY et al., 2002).

Quase concomitantemente com o início do período de soroconversão, linfócitos T citotóxicos, específicos para células infectadas apresentando epítomos da proteína Tax e de glicoproteínas do envelope, aparecem no sangue periférico (HISLOP et al., 1998; KABEYA; OHASHI; ONUMA, 2001). Comparando-se com os seres humanos, uma peculiaridade dos bovinos é que linfócitos T $\gamma\delta$ têm papel importante nesta resposta citotóxica (LUNDBERG; SPLITTER, 2000). Simultaneamente, a infecção pelo VLB também aciona uma resposta de células T CD4⁺, tanto dependente quanto independente de vírus (CALLEBAUT et al., 1993; KABEYA et al., 1999; STONE et al., 2000).

Verifica-se assim que uma resposta imune humoral e citotóxica muito ativa é iniciada logo após a infecção pelo VLB (KABEYA; OHASHI; ONUMA, 2001; OLDSTONE, 2006). Ressalta-se, contudo, que estas atividades antivirais desenvolvem-se e persistem durante toda a vida do animal, o que indica que o sistema imunitário é permanentemente estimulado por células apresentando antígenos do VLB (e, portanto, com atividade viral).

A infecção é seguida por uma expansão policlonal de uma grande e diversificada população de linfócitos portadores de um a cinco provírus integrados (CALLAHAN et al., 1976; KETTMANN et al., 1979). Em fases posteriores, alguns clones de células predominam e a população expandida de células evolui para monoclonalidade (GILLET et al., 2007).

No entanto, os mecanismos pelos quais ocorre esta expansão celular ainda são obscuros. Enfatiza-se que o provírus do VLB integra o genoma da célula infectada de forma aleatória e, portanto, não transforma as células por mutagênese insercional, como observado nos tumores induzidos pelo vírus da leucose aviária (KETTMANN et al., 1983; GREGOIRE et al., 1984). Outrossim, uma interferência na resposta apoptótica de células infectadas, associada ou não a um aumento na taxa da proliferação celular, podem contribuir tanto para a determinação da LP, quanto para a persistência viral (DEBACQ et al., 2002).

Realmente, tal desorganização 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.

Vários marcadores de proliferação (PCNA, KI67 e myc) são super-expressados em linfócitos B obtidos de tumores ou isolados de PBMCs de animais com LP (GUPTA et al., 1986; HAILATA et al., 1995; STONE et al., 1996), sugerindo um aumento da capacidade replicativa dessas células. Assim, diversos estudos têm verificado as taxas de proliferação de leucócitos de animais manifestando LP, visando elucidar a gênese deste aumento no número

de linfócitos.

No presente estudo, verificou-se que, tanto antes quanto 31 dias após o desafio antigênico, os índices médios de proliferação dos linfócitos obtidos de animais manifestando LP foram menores que aqueles observados em células obtidas dos animais pertencentes aos demais grupos, tanto sem prévio estímulo *in vitro*, quanto após estímulos com substâncias mitógenas. No entanto, este menor índice de proliferação em amostras obtidas de animais manifestando LP foi observado, 38 dias após o desafio antigênico, apenas nas células às quais não foi previamente adicionado estímulo *in vitro*.

Por sua vez, 17 dias após o desafio antigênico, verificou-se um índice de proliferação em linfócitos obtidos de animais manifestando LP maior que aquele observado em células obtidas dos animais pertencentes aos demais grupos, mas apenas após prévios estímulos *in vitro*.

Observou-se, também, que ocorreu aumento no índice de proliferação de linfócitos, 24 dias após o desafio antigênico, independente do grupo a que pertenciam os animais dos quais foram coletados.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para caracterizar a dinâmica e a migração de células infectadas. Um método *in vivo* é baseado na injeção intravenosa de análogos da timidina, que são incorporados no DNA quando uma célula divide-se (DEBACQ et al., 2003; 2004). Células assim marcadas podem ser detectadas por citometria de fluxo, dias após a injeção. Contudo, tal perfil cinético não depende só da proliferação celular, mas também é influenciado pela morte de células marcadas, expansão após a marcação e diluição do marcador (HELLERSTEIN, 1999).

Mesmo assim, esta abordagem revelou grandes diferenças entre a infecção experimental de ovinos e a infecção (natural ou experimental) de bovinos. A proliferação de células B é significativamente aumentada em ovinos infectados, quando comparada a animais não infectados, e esta diferença é ainda maior em ovinos manifestando LP (DEBACQ et al., 2002). Por sua vez, o estudo de Konnai et al. (2005), verificou que a proliferação espontânea, ou seja, sem prévio estímulo, é maior nas células de bovinos apresentando LP do que naquelas de animais alinfocitóticos ou soronegativos.

Em contrapartida, anteriormente, Debacq et al. (2003) haviam verificado que a proliferação de linfócitos B de bovinos com LP se encontrava reduzida em relação à dos animais alinfocitóticos.

Mais recentemente, Florins et al. (2008) afirmam que a proliferação de linfócitos é aumentada em ovinos, mas é reduzida em bovinos, em manifestações semelhantes da

enfermidade, revelando diferenças na dinâmica celular entre as duas espécies hospedeiras do VLB.

No presente estudo, os resultados permitem alvitrar que ensaios que visam comparar o índice de proliferação de linfócitos em bovinos infectados pelo VLB, por um lado, não são influenciados pela adição de estímulos mitogênicos *in vitro*. Todavia, são influenciados pela presença ou ausência de prévio estímulo antigênico *in vivo*, assim como, na sua presença, do tempo decorrido desde o estímulo.

Também, os resultados demonstram que o estímulo antigênico provoca um aumento no índice de proliferação de linfócitos, detectável 24 dias após o desafio. Além disso, verificou-se que esta maior proliferação, induzida pelo estímulo antigênico, não é influenciada pela infecção pelo VLB.

Outrossim, os resultados não nos permitem inferir que, em bovinos infectados pelo VLB, a LP seja decorrente de um maior índice de proliferação de linfócitos.

6.4 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR

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

Neste estudo, observou-se que, em todos os tempos de coleta, as porcentagens médias de leucócitos sofrendo processo de apoptose foram menores entre as células obtidas de animais manifestando LP. Tais resultados corroboram com aqueles verificados por Debacq et al. (2003), nos quais o índice de mortalidade dos linfócitos B em fase de divisão, em vacas infectadas pelo VLB, manifestando LP, estava significativamente reduzido.

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

Ressalta-se que não foi observada alteração nos processos envolvidos com a morte celular programada em ovinos infectados experimentalmente, manifestando LP Debacq et al.

(2002). Nestes animais, o aumento constante da população de células B, estimado em 7% ao dia (FLORINS et al., 2008), seria decorrente de um aumento nos índices de proliferação celular.

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

De fato, as EROs estão envolvidas na regulação de uma série de processos celulares, na dependência de sua concentração intracelular. Um efeito benéfico ocorre com concentrações baixas ou moderadas e está associado com a ativação e modulação da sinalização intracelular, a defesa contra agentes infecciosos e a indução de resposta mitogênica (THANNICKAL; FANBURG, 2000). No entanto, concentrações intracelulares excessivas de EROs causam dano a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e tornam-se tóxicas para a célula (FREEMAN; CRAPO, 1982).

Como defesa contra altas concentrações de EROs, a célula faz uso de diversas enzimas antioxidantes, tais como a Superóxido Desmutase, a Catalase, a Glutathione Peroxidase e a Tioredoxina. Deste modo, o estresse oxidativo é originado de um desbalanço entre a produção de EROs e a atividade antioxidante enzimática (SCHAFFER; BUETTNER, 2001).

Cabe ressaltar que a expressão alterada destas enzimas está relacionada com infecções virais. A proteína regulatória Tax, codificada pelo HTLV-1, estimula a expressão da Tioredoxina, resultando em uma menor concentração de EROs e maior sobrevivência da célula infectada (DARWICHE; ABOU-LTEIF; BAZARBACHI, 2007).

Avaliando bovinos naturalmente infectados pelo VLB, Azedo (2007) havia observado que leucócitos isolados de animais com LP apresentavam menor concentração intracelular de peróxido de hidrogênio, uma ERO. Além de uma possível influência na defesa contra patógenos intracelulares, aventada, à época, pelo autor, a constatação desta menor concentração pode estar relacionada, também, à gênese da LP em bovinos.

Assim, em vista dos resultados verificados no presente estudo, o menor índice de apoptose fornece, pelo menos em parte, uma potencial explicação lógica para o aumento do número de linfócitos circulantes em bovinos com LP.

Por sua vez, no ensaio em que se verificou o índice de morte celular por apoptose, foi possível observar, também, a porcentagem de leucócitos que estavam em processo de morte por necrose. Assim, verificou-se que, ao longo do período de coletas, as porcentagens médias

oscilaram. Todavia, não houve diferenças, a cada tempo de coleta, em função do grupo experimental.

Deste modo, tais resultados permitem-nos deduzir que eles não refletem um fenômeno biológico, mas alterações referentes ao processamento das amostras.

6.5 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS SÉRICAS

Uma das teorias que tentam explicar a gênese da LP baseia-se no fato de que a alteração de resposta imune celular (Th-1) para humoral (Th-2) possa estar envolvida com a progressão da enfermidade (PYEON; O'REILLY; SPLITTER, 1996). De fato, estudos indicam que o perfil de citocinas (séricas ou produzidas após cultura *in vitro* de PBMCs) diverge entre animais alinfocitóticos e manifestando LP.

Como esperado, em decorrência de sua atividade antiviral, o IFN- γ recombinante bovino suprime a replicação *in vitro* de células de ovinos infectadas pelo VLB (SENTSUI et al., 2001). Além disso, ovinos que apresentam expressão aumentada do mRNA do IFN- γ , têm menor carga proviral (USUI et al., 2007). Por sua vez, quando bovinos infectados pelo VLB são inoculados, por via intraperitoneal, com IFN- γ recombinante bovino, a porcentagem de linfócitos $\gamma\delta$ na circulação aumenta logo após um período de febre transitória, enquanto o número de linfócitos B infectados pelo VLB permanece baixo durante uma semana (MURAKAMI et al., 2004). Assim, indica-se uma potencial ação do IFN- γ no intuito de inibir a disseminação viral, colaborando para a manutenção do estado alinfocitótico.

Uma maior expressão do mRNA que codifica o IFN- γ é detectada na população de células T isoladas de linfonodos de bovinos infectados pelo VLB (KEEFE et al., 1997; KEEFE; FERRICK; STOTT, 1997). Em PBMCs, a expressão do mRNA do IFN- γ aumenta quatro semanas após a infecção experimental (YAKOBSON et al., 2000), mas a atividade antiviral continua inalterada (KLINTEVALL; FUXLER; FOSSUM, 1997). Em bovinos alinfocitóticos, a expressão do mRNA do IFN- γ está significativamente aumentada em relação àquela de bovinos manifestando LP (KONNAI et al., 2003b). Além disso, a quantidade de IFN- γ está elevada no interior de células de bovinos alinfocitóticos, mas não em células de animais com LP (KEEFE et al., 1997).

Apoiando tais resultados, no presente trabalho, observou-se que as concentrações séricas médias de IFN- γ em amostras sanguíneas de animais pertencentes ao grupo AL foram

maiores que aquelas observadas nos animais pertencentes aos demais grupos experimentais em todos os tempos de coleta, afora nas coletas realizadas três e dez dias após o desafio antigênico.

Nestes tempos de coleta, observou-se que, em todos os animais, houve um expressivo aumento nas concentrações séricas desta citocina, claramente demonstrando uma resposta ao estímulo antigênico.

Por sua vez, Pyeon e Splitter (1998) encontraram uma maior expressão do mRNA que codifica a IL-12 em PBMC de bovinos infectados sem linfocitose do que naqueles que apresentavam linfocitose. Foi sugerido, deste modo, o envolvimento da IL-12 na regulação da síntese do IFN- γ em animais alinfocitóticos.

Ressalta-se que Keefe et al. (1997) já haviam demonstrado elevados níveis de expressão dos mRNA codificando tanto a IL-12 quanto o INF- γ em bovinos que se encontravam com esta forma de apresentação da infecção. Em estudo posterior de Konnai et al. (2003b), a expressão do mRNA da fração p40 da IL-12 foi significativamente menor em bovinos com LP, em comparação aos animais alinfocitóticos.

Os resultados verificados no presente trabalho corroboram com estes estudos. Observou-se que as concentrações séricas médias de IL-12 em amostras sangüíneas de animais alinfocitóticos foram, em todos os tempos de coleta, excetuando-se a coleta realizada dez dias após o desafio antigênico, maiores que aquelas observadas nos animais pertencentes aos demais grupos experimentais.

Como verificado nos resultados referentes às concentrações séricas de IFN- γ , observou-se que, em todos os animais, houve um expressivo aumento nas concentrações séricas de IL-12 detectável dez dias após o desafio, claramente demonstrando uma resposta ao estímulo antigênico.

No entanto, estes resultados não nos permitem confirmar que o aumento nas concentrações séricas de IFN- γ ocorra em consequência do aumento das concentrações séricas de IL-12.

Pyeon, O'Reilly e Splitter (1996) e, posteriormente, Kabeya, Ohashi e Onuma (2001) sugeriram, então, que a alteração de uma resposta imune Th-1 (citotóxica e natural contra células infectadas por vírus) para Th-2 (humoral e que necessita de proliferação de linfócitos B) possa estar envolvida na gênese da LP e do linfossarcoma.

Amills et al. (2002) encontraram uma menor expressão do mRNA codificando IFN- α , IL-2 e IL-4 em PBMCs de bovinos com LP do que nas de animais alinfocitóticos. Outros autores haviam previamente observado que, em bovinos com esta manifestação da infecção,

ocorre um aumento na expressão do mRNA que codifica a IL-10 nestas células (PYEON; O'REILLY; SPLITTER, 1996; YAKOBSON et al., 1998; 2000).

Na realidade, a IL-10 influencia a expressão viral e a proliferação de células B em bovinos infectados pelo VLB. Em cultura de células de PBMC, a IL-10 inibe a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2), bem como a proliferação celular antígeno-específica. Além disso, a IL-10 suprime a síntese do derivado da COX-2 produzido por macrófagos, a prostaglandina E2, que estimula a expressão viral (PYEON; SPLITTER, 1999; PYEON; DIAZ; SPLITTER, 2000).

No presente estudo, verificou-se que as concentrações séricas médias de IL-10 em amostras sangüíneas de animais pertencentes a animais manifestando LP foram maiores que aquelas observadas nos animais pertencentes aos demais grupos, antes e 45 dias após o desafio antigênico. Todavia, por seis semanas após o desafio antigênico, não houve diferença na concentração sérica desta citocina entre os grupos experimentais.

Ao longo deste período, observou-se que, em todos os animais, ocorreram dois picos com expressivo aumento nas concentrações séricas de IL-10, detectáveis três e 31 dias após o desafio, indicando resposta ao estímulo antigênico.

Kabeya, Ohashi e Onuma (2001) sugeriram que, nesse ambiente de resposta imunitária do tipo Th2, a ação do TNF- α , induzida pela IL-10, sobre seus receptores na superfície de células infectadas seja determinante na gênese da LP.

De fato, em ovinos infectados pelo VLB, verificou-se que a expressão do mRNA do receptor tipo 1 do TNF- α está diminuída, enquanto a do mRNA do receptor tipo 2 permanece constante. Por sua vez, PBMCs infectadas pelo VLB expressam TNF- α ligado à membrana e proliferam em resposta ao TNF- α (KABEYA et al., 2001; USUI et al., 2006).

Por sua vez, em bovinos infectados pelo VLB, a expressão do mRNA do TNF- α é maior na população de PBMCs apresentando proliferação espontânea (PYEON; O'REILLY; SPLITTER, 1996; MEIROM et al., 1997; KONNAI et al., 2006). Além disso, quando TNF- α exógeno é adicionado *in vitro* a células infectadas pelo VLB, a expressão viral é fortemente reprimida (SENTSUI et al., 2001).

Células isoladas de bovinos com LP apresentaram maior resposta proliferativa na presença de TNF- α recombinante bovina (SENTSUI et al., 2001) e expressaram níveis significativamente mais elevados do mRNA do receptor tipo 2, que induz resposta celular proliferativa (KONNAI et al., 2005), embora nenhuma diferença tenha sido encontrada nos níveis do mRNA do receptor tipo 1.

Observou-se, no presente estudo, que as concentrações séricas médias de TNF- α , em

amostras obtidas de animais pertencentes ao grupo LP foram maiores que aquelas observadas nos animais pertencentes aos demais grupos experimentais em todos os tempos de coleta, excetuando-se a coleta realizada três dias após o desafio antigênico, quando houve um aumento nestas concentrações séricas em todos os animais, mais uma vez refletindo a resposta ao estímulo vacinal.

Novamente, estes resultados não nos permitem confirmar que o aumento nas concentrações séricas de TNF- α ocorra em consequência do aumento das concentrações séricas de IL-10.

Em resumo, de fato, no presente estudo, verificou-se que as concentrações séricas de IL-12 e de INF- γ foram maiores em animais infectados que não apresentavam LP e que as concentrações séricas de IL-10 e de TNF- α foram maiores em animais manifestando LP, especialmente antes do desafio antigênico. Tais resultados corroboram com aqueles relatados pelos demais autores, que verificaram maior expressão do mRNA que codifica estas citocinas nos animais infectados pelo VLB com as mesmas formas de apresentação da enfermidade.

Após o desafio, em determinados tempos, houve aumento nas concentrações das citocinas em todos os animais, que se tornaram similares entre os grupos experimentais. Nestes tempos de coleta, as concentrações séricas de citocinas refletiram a resposta imunitária frente ao desafio mais do que as diferenças induzidas pela infecção pelo VLB.

6.6 QUANTIFICAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS

Muito embora tem sido relatado que o VLB possa persistir em outros tipos celulares (ROVNAK et al., 1991; STOTT et al., 1991; HEENEY et al., 1992; BUEHRING et al., 1994; DOMENECH et al., 2000; ALTREUTHER et al., 2001; WU et al., 2003), parece claro que, em bovinos e ovinos, o principal alvo do vírus seja um linfócito B que expressa sIgM (AIDA et al., 1989; AIDA; OKADA; AMANUMA, 1993; MIRSKY; DA; LEWIN, 1993; VERNAU et al., 1997). Além desse marcador específico de linfócitos B, em ambas espécies as células infectadas frequentemente co-expressam a molécula CD5.

Além do mais, segundo Kabeya et al. (2001), em bovinos infectados manifestando LP, a maior parte das células expressando receptor do TNF- α do tipo 2, expressa também os marcadores CD5 ou sIgM, e estas células são menos propensas à apoptose induzida pelo TNF- α .

Diversos autores concordam que a linfocitose de células B, em animais infectados pelo VLB, essencialmente resulta de uma porcentagem aumentada de linfócitos B CD5⁺ circulantes, associada a um menor, porém significativo, aumento da população de células B CD5⁻ (DEPELCHIN et al., 1989; LETESSON et al., 1990; 1991; MEIROM; MOSS; BRENNER, 1997). Segundo Takahashi et al. (2004), o aumento favorecido da população de células CD5⁺ pode resultar de uma diferença em sua suscetibilidade à apoptose.

Por sua vez, embora o provírus tenha sido detectado tanto em linfócitos B CD5⁺, quanto em CD5⁻ de animais infectados, Wu et al. (1996) observaram que as células do linfossarcoma em bovinos parecem exibir principalmente, mas não exclusivamente, o fenótipo B CD5⁺.

De acordo com Florins et al. (2008), um outro marcador, a molécula de integrina CD11b, melhor define a população de células responsáveis pela LP. Segundo os autores, muito embora o vírus infecte tanto células CD11b⁺, quanto CD11b⁻, estas duas populações também apresentam diferenças marcantes na cinética celular.

Em ovinos experimentalmente infectados, Chevallier et al. (1988) já haviam observado que a LP ocorre em decorrência de uma expansão da população de linfócitos B expressando a molécula CD11b, apesar do fato de que tanto linfócitos B CD11b⁺ (linfócitos B1), quanto CD11b⁻ (linfócitos B2), estejam infectados.

Wu et al. (1996) também verificaram que, em alguns bovinos, células do linfossarcoma expressam a molécula CD11b. Deste modo, tais autores observaram que o linfossarcoma induzido pela infecção pelo VLB apresenta diversidade fenotípica. Em alguns animais, as células tumorais coexpressam marcadores de células B, CD5 e CD11b, caracterizando-as como linfócitos B1a. Em outros animais, as células tumorais coexpressam marcadores de células B e CD11b, não expressando o CD5 e, assim, caracterizando-as como linfócitos B1b. Ainda, em outros bovinos, as células B tumorais não expressam tanto o CD5 quanto o CD11b, caracterizando-as, então, como linfócitos B2 (ou linfócitos B convencionais).

Em outro estudo acerca do fenótipo do linfossarcoma induzido pela LEB, Yin et al. (2003) verificaram que a média de idade em que os diferentes tumores foram observados também divergia. Neste estudo, a média de idade dos animais apresentando linfossarcomas do tipo B1a foi de 8,6 anos e daqueles apresentando linfossarcomas do tipo B1b, foi de 6,5 anos. Por sua vez, bovinos infectados pelo VLB, que apresentavam linfossarcomas do tipo B2, tinham, em média, 4,5 anos de idade, demonstrando maior precocidade da manifestação tumoral e, por conseguinte, pior prognóstico.

Em decorrência destas observações, foi aventada a hipótese de que a LP poderia, do mesmo modo, envolver diferentes subpopulações de linfócitos B em diferentes animais. Caso

isto ocorresse, novos estudos poderiam verificar se animais apresentando LP de uma determinada subpopulação viriam a padecer de linfossarcomas de células da mesma subpopulação e, assim, poder-se-ia determinar o prognóstico mais precocemente.

No entanto, os resultados do presente estudo demonstraram que, em todos os animais manifestando LP, esta consiste de um aumento na quantidade de linfócitos B1a ($CD21^+$, $CD5^+$, $CD11b^+$). Observou-se que as porcentagens médias desta subpopulação foram, em todos os tempos de coleta, maiores nas amostras obtidas de animais manifestando LP do que nas amostras dos animais pertencentes aos demais grupos.

Da mesma forma, verificou-se que as porcentagens médias da subpopulação de linfócitos $CD21^+$, em todos os tempos de coleta, foram maiores nas amostras obtidas de animais manifestando LP do que nas obtidas dos animais pertencentes aos demais grupos experimentais, confirmando o fenótipo B das células responsáveis pela LP.

Observou-se, também, que, após o desafio antigênico, ocorreu uma diminuição nas porcentagens desta subpopulação (detectada entre três e 38 dias após a vacinação) no sangue obtido de todos os animais. Posto que a vacinação induz uma resposta humoral, supõe-se que, em decorrência deste desafio, linfócitos B diferenciem-se em plasmócitos (produtores de anticorpos e não mais expressando a molécula CD21 em suas superfícies).

Por sua vez, as porcentagens médias das subpopulações de linfócitos B1b ($CD21^+$, $CD5^-$, $CD11b^+$), de linfócitos B2 ($CD21^+$, $CD5^-$, $CD11b^-$) e de linfócitos B $CD5^+$ $CD11b^-$ oscilaram, em todos os animais e independente do grupo, durante o período experimental.

Mesmo assim, constatou-se que a maior parte dos linfócitos B, em bovinos, consiste de linfócitos B1, como haviam suposto Zhao, Jackson e Aitken (2006).

Ainda, pôde-se observar que a diminuição da porcentagem de linfócitos B no sangue dos animais pertencentes aos grupos SN e AL, após o desafio, ocorreu mais especificamente na subpopulação de linfócitos B1a. Contudo, em animais infectados manifestando LP, esta diferenciação possivelmente ocorreu a partir de linfócitos B2.

Verificou-se uma menor porcentagem de linfócitos $CD3(+)$ e de linfócitos $CD2(+)$, que são marcadores de superfície específicos de linfócitos T, em todos os tempos de coleta, nas amostras obtidas de animais manifestando LP do que nas obtidas dos animais pertencentes aos demais grupos experimentais. Do mesmo modo, foi observado que as porcentagens médias das subpopulações de linfócitos T (linfócitos $CD3^+$ $CD4^+$ e linfócitos $CD3^+$ $CD8^+$), em todos os tempos de coleta, foram menores nas amostras obtidas de animais manifestando LP do que nas obtidas dos animais pertencentes aos demais grupos. Todavia, não houve diferença entre os valores absolutos desta subpopulações em função do grupo experimental, indicando que a

infecção pelo VLB não altera a quantidade de linfócitos T circulantes.

Não obstante, não houve diferenças nas porcentagens destas subpopulações de linfócitos T ao longo dos tempos de coleta, indicando que o desafio antigênico não altera tal cinética.

No entanto, praticamente em todos os tempos de coleta, a média das relações entre linfócitos CD3(+) CD4(+) e CD3(+) CD8(+), nas amostras obtidas de animais manifestando LP foram menores que aquelas verificadas em amostras de animais pertencentes aos demais grupos, denotando maior porcentagem de linfócitos T CD8⁺ e uma maior participação da imunidade celular em animais infectados, apresentando LP.

Tendo em vista que linfócitos citotóxicos atuam na eliminação de células infectadas por vírus quando estas apresentam antígenos virais utilizando-se de moléculas do MHC de classe I (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010), supõe-se que, em animais infectados pelo VLB, manifestando LP, existam linfócitos infectados em que ocorre atividade viral.

Curiosamente, observou-se que as porcentagens médias da subpopulação de leucócitos WC1⁺, um marcador de linfócitos $\gamma\delta$, foram maiores nas amostras obtidas de animais manifestando LP do que nas obtidas dos animais pertencentes aos demais grupos experimentais, em todos os tempos de coleta, excetuando-se a coleta ocorrida antes e 17 dias após o desafio antigênico. Este resultado poderia contradizer a hipótese postulada por Lundberg e Splitter (2000) e por Murakami et al. (2004), que indicam que a eliminação de células infectadas, expressando antígenos do VLB, na fase alinfocitótica, ocorra por meio da ação desta população linfocitária.

No entanto, segundo hipótese postulada, recentemente, por Guillet et al. (2007), poucos linfócitos expressando proteínas virais podem ser detectados, *in vivo*, em animais apresentando esta manifestação da infecção. Assim, a frequência de células infectadas que sobrevivem à pressão imunitária do hospedeiro é baixa, justificando a não observação de um aumento relativo na porcentagem de linfócitos $\gamma\delta$, em animais alinfocitóticos. Por sua vez, a maior porcentagem de linfócitos T CD8⁺, em animais com LP, indica a presença de atividade viral, justificando a maior quantidade de linfócitos $\gamma\delta$.

Ainda, observou-se que, após o desafio antigênico, ocorreu uma diminuição nas porcentagens desta subpopulação (detectada entre três e 38 dias após a vacinação) no sangue obtido de todos os animais. Tal diminuição acompanhou aquela verificada na população de linfócitos B (CD21+).

Finalmente, verificou-se, também, no presente estudo, uma oscilação nas porcentagens médias de células CD14⁺, um marcador de superfície encontrado em células da linhagem monócito/macrófago. Tal oscilação pode ser justificada por alterações no status infeccioso dos

animais selecionados para o estudo, posto que, apesar de mostrarem, a todo tempo, sinais de higidez, eles, certamente, estavam sendo expostos a patógenos de maneira diversa, porém constante.

6.7 AVALIAÇÃO GLOBAL DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS

Muito embora vacinas utilizando partículas virais inativadas (como a utilizada no presente estudo) induzam uma resposta limitada em relação àquelas que utilizam vírus atenuados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010), elas promovem proteção contra infecções por meio do estímulo à produção de anticorpos, da ativação de células efectoras e da diferenciação de células de memória.

Tal resposta imunitária humoral inicia-se nos órgãos linfóides secundários (no baço, contra antígenos presentes na circulação, nos linfonodos, contra antígenos que penetram no organismo através da pele, ou em tecidos linfóides associados à mucosa, contra antígenos inalados ou ingeridos) (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003). Deste modo, após vacinação subcutânea, antígenos virais são processados por células apresentadoras de antígenos (APCs), que migram ao linfonodo que drena a região de inoculação e apresentam tais antígenos aos linfócitos nele localizados.

Em uma resposta imunitária secundária, antígenos protéicos ligados ao MHC de classe II na superfície das APCs são, nos linfonodos, reconhecidos por linfócitos T auxiliares e por linfócitos B de memória específicos, deflagrando uma resposta humoral dependente de células T. Linfócitos T auxiliares assim ativados secretam citocinas que estimulam a proliferação dos linfócitos B, inversão do isotipo de imunoglobulina, diferenciação em novas células de memória e plasmócitos e consequente produção de anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010).

Plasmócitos assim gerados migram para a medula óssea, vivem por meses e produzem a maior quantidade de imunoglobulina sérica em resposta ao antígeno vacinal (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010). Respostas humorais secundárias, como a avaliada no presente estudo, consistem, quase que integralmente, na produção de imunoglobulinas do isotipo IgG. Por sua vez, a seleção do subtipo de imunoglobulina é dependente do perfil de citocinas secretado pelos linfócitos T auxiliares (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003).

Assim, constatou-se, no presente estudo, que a resposta imunitária de bovinos após

vacinação contra o vírus da febre aftosa fundamentou-se na produção de IgG2, caracterizando envolvimento de linfócitos T auxiliares do tipo 1, produtores de INF- γ . Ainda, esta resposta foi menos intensa em animais infectados pelo VLB, manifestando LP.

De fato, concentrações séricas de INF- γ , cerca de cinco a sete vezes maiores que aquelas observadas antes da vacinação, foram verificadas após o desafio. No entanto, a constatação de elevação das concentrações séricas de IL-10, citocina produzida por linfócitos T auxiliares do tipo 2 e necessária para proliferação e diferenciação dos linfócitos B, indica a interação entre diferentes subpopulações de linfócitos T auxiliares para a deflagração da resposta humoral dependente de linfócitos T.

Apesar do fato de que esta proliferação de linfócitos B ocorra nos linfonodos, uma pequena elevação nos índices de proliferação foi verificada em linfócitos obtidos do sangue periférico de animais apresentando LP, após o desafio antigênico. A observação de uma diminuição na porcentagem de linfócitos B na circulação e de uma pequena elevação na porcentagem de linfócitos T, neste período, sugere que esta proliferação inicial ocorra como uma resposta a uma porcentagem menor de linfócitos T em animais com LP. Como, em decorrência da leucocitose existente nesses animais, a quantidade absoluta de linfócitos T supera aquela observada em animais sem LP, pode-se supor que, em animais com LP, seja necessária uma maior quantidade de linfócitos T para uma adequada produção de citocinas, sugerindo, também, alteração funcional nestas células.

Curiosamente, foi observado um aumento nos índices de proliferação linfocitária 34 dias após a vacinação, seguida de uma elevação na concentração sérica de IL-10 e da porcentagem de linfócitos $\gamma\delta$ (leucócitos WC1⁺) circulantes, detectáveis 31 dias após o desafio.

Em maior quantidade no sangue periférico, quando comparada com aquela verificada em humanos, em bezerros, representam acima de 40% das PBMC, ao passo que, em ruminantes adultos, perfazem entre dez e 15% das PBMC (WYATT et al., 1994). Supõe-se que esta maior quantidade reflita a defesa contra diferentes patógenos aos quais os bovinos são expostos, entretanto tem sido demonstrado que linfócitos $\gamma\delta$ apresentam uma extensa variedade de funções, incluindo produção de citocinas, atividade citotóxica, imunomodulação, organização de granuloma e regulação do processo inflamatório (POLLOCK; WELSH, 2002). Especificamente, em bovinos experimentalmente infectados com o vírus da febre aftosa, foi observado que estas células estão envolvidas na lise de células infectadas (AMADORI et al., 1995). No entanto, outros estudos ressaltam o papel imunorregulador destas células, particularmente por meio do efeito supressor na produção de anticorpos

(HOWARD et al., 1989) e na proliferação de outras PBMC (HOWARD et al., 1989; LUTJE; BLACK, 1991).

Deste modo, os resultados indicam que o controle da produção de IgG2, em uma resposta imunitária secundária após a vacinação contra o vírus da febre aftosa, é resultado da ação de linfócitos $\gamma\delta$, posto que as concentrações séricas deste subtipo de imunoglobulinas diminuíram, em todos os animais, após o aumento da porcentagem de linfócitos $\gamma\delta$ circulantes.

Seguindo este ensejo, a menor concentração sérica de IgG2 verificada em animais manifestando LP parece ser consequência da ação de uma maior porcentagem de linfócitos $\gamma\delta$ circulantes (também observada nestes animais, no período). De fato, aos 24 dias após o desafio, foi verificado, também, um pequeno aumento (não significativo) na porcentagem de linfócitos B1a (células infectadas pelo VLB) na circulação de animais com LP. Assim, o aumento mais expressivo da quantidade de linfócitos $\gamma\delta$ observado nestes animais sugere sua ação na eliminação destas células (evidenciada pela relativa diminuição na porcentagem de linfócitos B1a detectada 38 dias após o desafio) e que elas estariam expressando antígenos do VLB.

7 CONCLUSÃO

Pelos métodos utilizados, foi possível constatar que animais infectados pelo VLB, manifestando LP, apresentam alterações na resposta imunitária frente vacinação contra o vírus da febre aftosa, e concluir que:

- a resposta humoral secundária após vacinação contra o vírus da febre aftosa, em bovinos, fundamenta-se em uma maior produção de IgG2 detectável três dias e com pico 17 dias após o desafio, estabilizando-se, em animais sem LEB e nos infectados sem LP, até 38 dias pós-vacinação, quando retorna a valores semelhantes aos verificados antes do desafio. Entretanto, animais com LP apresentam resposta humoral menos intensa e menos duradoura. Frente este desafio, não há alteração nas concentrações séricas médias de IgG1, de IgM e de IgA, nem diferenças entre animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais;
- ensaios que visam comparar o índice de proliferação de linfócitos em bovinos infectados pelo VLB não são influenciados pela adição de estímulos mitogênicos *in vitro*, mas por prévios estímulos antigênicos;
- ocorre um aumento no índice de proliferação de linfócitos sanguíneos, em bovinos, 24 dias após a vacinação contra o vírus da febre aftosa, independente da presença de infecção pelo VLB. A partir deste momento, ocorre um aumento na porcentagem de linfócitos $\gamma\delta$ circulantes e posterior diminuição nas concentrações séricas de IgG2, indicando regulação desta resposta humoral por linfócitos $\gamma\delta$. Em bovinos com LP, o aumento na porcentagem de linfócitos $\gamma\delta$ circulantes é maior, ocasionando diminuição mais intensa e mais precoce nas concentrações séricas de IgG2.
- a LP ocorre em decorrência de menor índice de apoptose, posto que as porcentagens de leucócitos sofrendo processo de apoptose são menores, entre as células obtidas de animais manifestando LP, do que aquelas verificadas nos animais pertencentes aos demais grupos experimentais;
- as concentrações séricas das citocinas de perfil Th1, IL-12 e IFN- γ , são maiores em amostras sangüíneas de animais infectados pelo VLB, alinfocitóticos, ao passo que as concentrações séricas das citocinas de perfil Th2, IL-10 e TNF- α , são maiores em amostras sangüíneas de animais infectados manifestando LP, indicando que alterações

no perfil sérico de citocinas podem ser causa ou consequência da LP;

- em resposta ao desafio vacinal, ocorre uma elevação nas concentrações séricas de IL-10, de TNF- α e de IFN- γ , três dias após o desafio, e de IL-12, dez dias após o desafio. A elevação na concentração sérica de IL-10 perdura até 31 dias após o desafio e pode ser responsável pelo maior índice de proliferação de linfócitos $\gamma\delta$ verificado a partir de 31 dias após a vacinação;
- a maioria dos linfócitos B circulantes, em bovinos, consiste de linfócitos B1 e, em animais infectados pelo VLB, a LP ocorre em decorrência de um aumento na porcentagem de linfócitos B1a;
- em animais infectados pelo VLB, apresentando LP, as relações entre linfócitos T auxiliares e citotóxicos são menores e a porcentagem de linfócitos $\gamma\delta$ é maior, indicando atividade viral nas células infectadas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. 6th. ed., Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010. 566 p.
- ACHACHI, A.; FLORINS, A.; GILLET, N.; DEBACQ, C.; URBAIN, P.; FOUTSOP, G. M.; VANDERMEERS, F.; JASIK, A.; REICHERT, M.; KERKHOFS, P.; LAGNEAUX, L.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, n. 29, p. 10309-10314, 2005.
- AIDA, Y.; MIYASAKA, M.; OKADA, K.; ONUMA, M.; KOGURE, S.; SUZUKI, M.; MINOPRIO, P.; LEVY, D.; IKAWA, Y. Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. **Am. J. Vet. Res.**, v. 50, n. 11, p. 1946-1951, 1989.
- AIDA, Y.; OKADA, K.; AMANUMA, H. Phenotype and ontogeny of cells carrying a tumor-associated antigen that is expressed on bovine leukemia virus-induced lymphosarcoma. **Cancer Res.**, v. 53, n. 2, p. 429-437, 1993.
- ALTANEROVA, V.; HOLICOVA, D.; KUCEROVA, L.; ALTANER, C.; LAIRMORE, M. D.; BORIS-LAWRIE, K. Long-term infection with retroviral structural gene vector provides protection against bovine leukemia virus disease in rabbits. **Virology**, v. 329, n. 2, p. 434-439, 2004.
- ALTREUTHER, G.; LLAMES, L.; NEUENSCHWANDER, S.; LANGHANS, W.; WERLING, D. Morphologic and functional changes in bovine monocytes infected in vitro with the bovine leukaemia virus. **Scand. J. Immunol.**, v. 54, n. 5, p. 459-469, 2001.
- AMADORI, M.; ARCHETTI, I. L.; VERARDI, R.; BERNERI, C. Role of a distinct population of bovine gamma delta T cells in the immune response to viral agents. **Viral Immunol.**, v. 8, n. 2, p. 81-91, 1995.
- AMILLS, M.; RAMIYA, V.; NORIMINE, J.; OLMSTEAD, C. A.; LEWIN, H. A. Reduced IL-2 and IL-4 mRNA expression in CD4+ T cells from bovine leukemia virus-infected cows with persistent lymphocytosis. **Virology**, v. 304, n. 1, p. 1-9, 2002.
- ASQUITH, B.; DEBACQ, C.; FLORINS, A.; GILLET, N.; SANCHEZ-ALCARAZ, T.; MOSLEY, A.; WILLEMS, L. Quantifying lymphocyte kinetics in vivo using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE). **Proc. Biol. Sci.**, v. 273, n. 1590, p. 1165-1171, 2006a.
- ASQUITH, B.; EDWARDS, C. T.; LIPSITCH, M.; MCLEAN, A. R. Inefficient cytotoxic T lymphocyte-mediated killing of HIV-1-infected cells in vivo. **PLoS Biol.**, v. 4, n. 4, p. 90, 2006b.
- 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.
- AZEDO, M. R.; MASSOCO, C. O.; BLAGITZ, M. G.; SANCHES, B. G. S.; SOUZA, F. N.; BATISTA, C. F.; SAKAI, M.; SÁ-ROCHA, L. C.; KFOURY JÚNIOR, J. R.; BENESI, F. J.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Influência da Leucose Enzoótica Bovina na função fagocítica de leucócitos circulantes em animais manifestando linfocitose persistente. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 45, n. 5, p. 390-397, 2008.

BAUMGARTENER, L. E.; OLSON, C.; MILLER, J. M.; VAN DER MAATEN, M. J. Survey for antibodies to leukemia (C-type) virus in cattle. **J. Am. Vet. Méd. Assoc.**, v. 166, n. 3, p. 249-251, 1975.

BEYER, J.; KOLLNER, B.; TEIFKE, J. P.; STARICK, E.; BEIER, D.; REIMANN, I.; GRUNWALD, U.; ZILLER, M. Cattle infected with bovine leukaemia virus may not only develop persistent B-cell lymphocytosis but also persistent B-cell lymphopenia. **J. Vet. Méd. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, v. 49, n. 6, p. 270-277, 2002.

BIRGEL JÚNIOR, E. H. Dinâmica das proteínas séricas de fêmeas bovinas da raça Holandesa naturalmente infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 615-619, 2001.

BIRGEL JÚNIOR, 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 Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnóstico. In: BIRGUEL, E. H.; BENESI, F. J. (Ed.). **Patologia clínica veterinária**. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 249-260.

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 leiteiros 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: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1983. p. 71.

BOUZAR, A. B.; BOXUS, M.; FLORINS, A.; FRANCOIS, C.; REICHERT, M.; WILLEMS, L. Reduced levels of reactive oxygen species correlate with inhibition of apoptosis, rise in thioredoxin expression and increased bovine leukemia virus proviral loads. **Retrovirology**, v. 6, p. 102, 2009.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Erradicação da Febre aftosa**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 27 set 2009.

BUEHRING, G. C.; KRAMME, P. M.; SCHULTZ, R. D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. **Lab. Invest.**, v. 71, n. 3, p. 359-365, 1994.

BUEHRING, G. C.; PHILPOTT, S. M.; CHOI, K. Y. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 19, n. 12, p. 1105-1113, 2003.

BURNY, A.; CLEUTER, Y.; KETTMANN, R.; MAMMERICKX, M.; MARBAIX, G.; PORTETELLE, D.; VAN DEN BROEKE, A.; WILLEMS, L.; THOMAS, R. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. **Vet. Microbiol.**, v. 17, n. 3, p. 197-218, 1988.

BUTLER, J. E. Bovine immunoglobulins: an augmented review. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 4, n. 1/2, p. 43-152, 1983.

CALLAHAN, R.; LIEBER, M. M.; TODARO, G. J.; GRAVES, D. C.; FERRER, J. F. Bovine leukemia virus genes in the DNA of leukemic cattle. **Science**, v. 192, n. 4243, p. 1005-1007, 1976.

CALLEBAUT, I.; VONECHE, V.; MAGER, A.; FUMIERE, O.; KRCHNAK, V.; MERZA, M.; ZAVADA, J.; MAMMERICKX, M.; BURNY, A.; PORTETELLE, D. Mapping of B-neutralizing and T-helper cell epitopes on the bovine leukemia virus external glycoprotein gp51. **J. Virol.**, v. 67, n. 9, p. 5321-5327, 1993.

- CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística**: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed, 2003. 256 p.
- CAMARGOS, M. F.; PEREDA, A.; STANCEK, D.; ROCHA, M. A.; DOS REIS, J. K.; GREISER-WILKE, I.; LEITE, R. C. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine leukemia virus. **Virus Genes**, v. 34, n. 3, p. 343-350, 2007.
- CARLI, K. T.; SEN, A.; BATMAZ, H.; KENNERMAN, E. Detection of IgG antibody to bovine leukaemia virus in urine and serum by two enzyme immunoassays. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 28, n. 6, p. 416-418, 1999.
- CARN, V. M. The role of dipterous insects in the mechanical transmission of animal viruses. **Br. Vet. J.**, v. 152, n. 4, p. 377-393, 1996.
- CARNEIRO, P. A. M. **Leucose enzootica 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.
- CHEVALLIER, N.; BERTHELEMY, M.; LE RHUN, D.; LAINE, V.; LEVY, D.; SCHWARTZ-CORNIL, I. Bovine leukemia virus-induced lymphocytosis and increased cell survival mainly involve the CD11b+ B-lymphocyte subset in sheep. **J. Virol.**, v. 72, n. 5, p. 4413-4420, 1998.
- CHEVRIER, L.; GAYOT, G. [Study of the white cell formula of the Charolais ox with a view to its use in detection of leucosis]. **Bull. Off. Int. Epizoot.**, v. 66, n. 1, p. 783-793, 1966.
- CHI, J.; VANLEEUEWEN, J. A.; WEERSINK, A.; KEEFE, G. P. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum. **Prev. Vet. Med.**, v. 55, n. 2, p. 137-153, 2002.
- CHOI, K. Y.; LIU, R. B.; BUEHRING, G. C. Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. **J. Virol. Methods**, v. 104, n. 1, p. 33-39, 2002.
- 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**. 5th. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 614-619.
- CORDEIRO, J. L. F.; DESCYHAMPS, F.; MARTINS, E.; MARTINS, V. M. V. Identification and control of bovine enzootic leukosis in a dairy-herd. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 29, n. 8, p. 1287-1292, 1994.
- CUNHA, R. G.; TEIXEIRA, A. C.; DE SOUZA, D. M. Antigens of bovine leukosis virus and precipitating antibodies in sera of cattle. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 17, n. 9, p. 1363-1370, 1982.
- D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 30, n. 1, p. 13-15, 1998a.
- D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Productive and reproductive performance in cattle infected with bovine leukosis virus. **J. Dairy Res.**, v. 65, n. 4, p. 693-695, 1998b.
- DARWICHE, N.; ABOU-LTEIF, G.; BAZARBACHI, A. Reactive oxygen species mediate N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced cell death in malignant T cells and are inhibited by the HTLV-I oncoprotein Tax. **Leukemia**, v. 21, n. 2, p. 261-269, 2007.

- DEBACQ, C.; ASQUITH, B.; KERKHOFS, 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. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 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. **J. Virol.**, v. 77, n. 24, p. 13073-13083, 2003.
- DEBACQ, C.; GILLET, N.; ASQUITH, B.; SANCHEZ-ALCARAZ, M. T.; FLORINS, A.; BOXUS, M.; SCHWARTZ-CORNIL, I.; BONNEAU, M.; JEAN, G.; KERKHOFS, P.; HAY, J.; THEWIS, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Peripheral blood B-cell death compensates for excessive proliferation in lymphoid tissues and maintains homeostasis in bovine leukemia virus-infected sheep. **J. Virol.**, v. 80, n. 19, p. 9710-9719, 2006.
- DEBACQ, C.; SANCHEZ ALCARAZ, M. T.; MORTREUX, F.; KERKHOFS, P.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Reduced proviral loads during primo-infection of sheep by Bovine Leukemia virus attenuated mutants. **Retrovirology**, v. 1, p. 31, 2004.
- DEPELCHIN, A.; LETESSON, J. J.; LOSTRIE-TRUSSART, N.; MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; BURNY, A. Bovine leukemia virus (BLV)-infected B-cells express a marker similar to the CD5 T cell marker. **Immunol. Lett.**, v. 20, n. 1, p. 69-76, 1989.
- DEREN, W.; SZEWCZYK-SADOWSKA, A.; RULKA, J. The eradication of enzootic bovine leucosis in a large farm population. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 6, n. 3, p. 12-14, 2003.
- DOMENECH, A.; GOYACHE, J.; LLAMES, L.; JESUS PAYA, M.; SUAREZ, G.; GOMEZ-LUCIA, E. In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. **J. Gen. Virol.**, v. 81, n. 1, p. 109-118, 2000.
- DONOVAN, R. M. Retroviridae. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. (Ed.). **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 411-428.
- DUKKIPATI, V. S.; BLAIR, H. T.; GARRICK, D. J.; MURRAY, A. Ovar-Mhc--ovine major histocompatibility complex: role in genetic resistance to diseases. **N. Z. Vet. J.**, v. 54, n. 4, p. 153-160, 2006.
- DUS SANTOS, M. J.; TRONO, K.; LAGER, I.; WIGDOROVITZ, A. Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. **Vet. Microbiol.**, v. 119, n. 1, p. 10-18, 2007.
- EDLICH, R. F.; ARNETTE, J. A.; WILLIAMS, F. M. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). **J. Emerg. Med.**, v. 18, n. 1, p. 109-119, 2000.
- FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANIOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus taxonomy**: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2004. 1162 p.
- FERENS, W. A.; HALVER, M.; GUSTIN, K. E.; OTT, T.; HOVDE, C. J. Differential sensitivity of viruses to the antiviral activity of Shiga toxin 1 A subunit. **Virus Res.**, v. 125, n. 1, p. 104-108, 2007.
- FLAMING, K. P.; FRANK, D. E.; CARPENTER, S.; ROTH, J. A. Longitudinal studies of immune function in cattle experimentally infected with bovine immunodeficiency-like virus and/or bovine leukemia virus. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, n. 1/2, p. 27-38, 1997.
- FLORINS, A.; BOXUS, M.; VANDERMEERS, F.; VERLAETEN, O.; BOUZAR, A. B.; DEFOICHE, J.; HUBAUX, R.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Emphasis on cell

turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: A rationale for host susceptibility to disease. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 125, n. 1/2, p. 1-7, 2008.

FLORINS, A.; REICHERT, M.; ASQUITH, B.; BOUZAR, A. B.; JEAN, G.; FRANCOIS, C.; JASIK, A.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Earlier onset of delta-retrovirus-induced leukemia after splenectomy. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. 6943, 2009.

FOSSUM, C.; BURNY, A.; PORTETELLE, D.; MAMMERICKX, M.; MOREIN, B. Detection of B and T cells, with lectins or antibodies, in healthy and bovine leukemia virus-infected cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 18, n. 3, p. 269-278, 1988.

FRANCOZ, D.; LAPOINTE, J. M.; WELLEMAN, V.; DESROCHERS, A.; CASWELL, J. L.; STOTT, J. L.; DUBREUIL, P. Immunoglobulin G2 deficiency with transient hypogammaglobulinemia and chronic respiratory disease in a 6-month-old Holstein heifer. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 16, n. 5, p. 432-435, 2004.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab. Invest.**, v. 47, n. 5, p. 412-426, 1982.

FREITAS, T. R.; ROMERO, C. H. Experimental transmission of bovine leukosis virus by leucocytes recovered from the stable fly *Stomoxys calcitrans* L. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, n. 10, p. 1017-1023, 1991.

FULTON, B. E.; PORTELLA, M.; RADKE, K. Dissemination of bovine leukemia virus-infected cells from a newly infected sheep lymph node. **J. Virol.**, v. 80, n. 16, p. 7873-7884, 2006.

GARCIA, M. **Avaliação da resposta imunitária em bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose**. 1992. 71 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

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.

GATEI, M. H.; LAVIN, M. F.; DANIEL, R. C. Serum immunoglobulin concentrations in cattle naturally infected with bovine leukemia virus. **Zentralbl. Veterinarmed. B**, v. 37, n. 8, p. 575-580, 1990.

GEHRKE, E.; VERTER, W.; SCHMALZ, G.; KAULITZKE, E. Lymphocyte code for the diagnosis of bovine leukosis in herds under sanitation. **Monatsh. Veterinarmed.**, v. 26, n. 15, p. 567-572, 1971.

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

GREGOIRE, D.; COUEZ, D.; DESCHAMPS, J.; HEUERTZ, S.; HORS-CAYLA, M. C.; SZPIRER, J.; SZPIRER, C.; BURNY, A.; HUEZ, G.; KETTMANN, R. Different bovine leukemia virus-induced tumors harbor the provirus in different chromosomes. **J. Virol.**, v. 50, n. 1, p. 275-279, 1984.

GUPTA, P.; KASHMIRI, S. V.; ERISMAN, M. D.; ROTHBERG, P. G.; ASTRIN, S. M.; FERRER, J. F. Enhanced expression of the c-myc gene in bovine leukemia virus-induced bovine tumors. **Cancer Res.**, v. 46, n. 12, p. 6295-6298, 1986.

- HAILATA, N.; JOHNSON, R.; AL-BAGDADI, F.; HANASH, S. Proliferating cell nuclear antigen expression in sheep infected with bovine leukemia virus. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 44, n. 3/4, p. 211-222, 1995.
- HEENEY, J. L.; VALLI, P. J.; JACOBS, R. M.; VALLI, V. E. Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. **Lab. Invest.**, v. 66, n. 5, p. 608-617, 1992.
- HEENEY, J. L.; VALLI, V. E.; MONTESANTI, J. Alterations in humoral immune response to bovine leukaemia virus antigens in cattle with lymphoma. **J. Gen. Virol.**, v. 69, n. 3, p. 659-666, 1988.
- HEIN, W. R.; GRIEBEL, P. J. A road less travelled: large animal models in immunological research. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 1, p. 79-84, 2003.
- HELLERSTEIN, M. K. Measurement of T-cell kinetics: recent methodologic advances. **Immunol. Today**, v. 20, n. 10, p. 438-441, 1999.
- HISLOP, A. D.; GOOD, M. F.; MATEO, L.; GARDNER, J.; GATEI, M. H.; DANIEL, R. C.; MEYERS, B. V.; LAVIN, M. F.; SUHRBIER, A. Vaccine-induced cytotoxic T lymphocytes protect against retroviral challenge. **Nat. Med.**, v. 4, n. 10, p. 1193-1196, 1998.
- 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.
- HOWARD, C. J.; SOPP, P.; PARSONS, K. R.; FINCH, J. *In vivo* depletion of BoT4 (CD4) and of non-T4/T8 lymphocyte subsets in cattle with monoclonal antibodies. **Eur. J. Immunol.**, v. 19, n. 4, p. 757-764, 1989.
- IKEDA, M.; KONNAI, S.; ONUMA, M.; ISHIGURO, N.; GORYO, M.; OKADA, K. Immunohistochemical analysis of expression patterns of tumor necrosis factor receptors on lymphoma cells in enzootic bovine leukosis. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 67, n. 4, p. 425-432, 2005.
- INSINGA, A.; MONESTIROLI, S.; RONZONI, S.; GELMETTI, V.; MARCHESI, F.; VIALE, A.; ALTUCCI, L.; NERVI, C.; MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. **Nat. Med.**, v. 11, n. 1, p. 71-76, 2005.
- JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. 6th. ed., New York: Garland, 2004. 800 p.
- JOHNSON, J. M.; HARROD, R.; FRANCHINI, G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, n. 3, p. 135-147, 2001.
- JULIARENA, M. A.; GUTIERREZ, S. E.; CERIANI, C. Determination of proviral load in bovine leukemia virus-infected cattle with and without lymphocytosis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 68, n. 11, p. 1220-1225, 2007.
- JULIARENA, M. A.; POLI, M.; CERIANI, C.; SALA, L.; RODRIGUEZ, E.; GUTIERREZ, S.; DOLCINI, G.; ODEON, A.; ESTEBAN, E. N. Antibody response against three widespread bovine viruses is not impaired in Holstein cattle carrying bovine leukocyte antigen DRB3.2 alleles associated with bovine leukemia virus resistance. **J. Dairy Sci.**, v. 92, n. 1, p. 375-381, 2009.
- KABEYA, H.; FUKUDA, A.; OHASHI, K.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Tumor necrosis factor alpha and its receptors in experimentally bovine leukemia virus-infected sheep. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 81, n. 1/2, p. 129-139, 2001.

- KABEYA, H.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Host immune responses in the course of bovine leukemia virus infection. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 63, n. 7, p. 703-708, 2001.
- KABEYA, H.; OHASHI, K.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Characterization of immune responses caused by bovine leukemia virus envelope peptides in sheep. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 61, n. 5, p. 475-480, 1999.
- KALE, M.; YAVRU, S.; YAPKIC, O. Evaluation of serological and haematological tests for the diagnosis of bovine leucosis virus infection. **Indian Vet. J.**, v. 82, n. 8, p. 841-843, 2005.
- KARPAS, A. Human retroviruses in leukaemia and AIDS: reflections on their discovery, biology and epidemiology. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, v. 79, n. 4, p. 911-933, 2004.
- KEEFE, R. G.; CHOI, Y.; FERRICK, D. A.; STOTT, J. L. Bovine cytokine expression during different phases of bovine leukemia virus infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 56, n. 1/2, p. 39-51, 1997.
- KEEFE, R. G.; FERRICK, D. A.; STOTT, J. L. Cytokine transcription in lymph nodes of cattle in different stages of bovine leukemia virus infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 59, n. 3/4, p. 271-283, 1997.
- 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.; WESTIN, E. H.; MARBAIX, G.; DESCHAMPS, J.; WONG-STAAAL, F.; GALLO, R. C.; BURNY, A. Lack of expression of cellular homologues of retroviral onc genes in bovine tumors. **Haematol. Blood Transfus.**, v. 28, p. 218-221, 1983.
- KLINTEVALL, K.; FUXLER, L.; FOSSUM, C. Bovine leukemia virus: early reflections in blood after an experimental infection of calves. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 20, n. 2, p. 119-130, 1997.
- KONNAI, S.; TAKESHIMA, S. N.; TAJIMA, S.; YIN, S. A.; OKADA, K.; ONUMA, M.; AIDA, Y. The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. **Microbiol. Immunol.**, v. 47, n. 3, p. 223-232, 2003a.
- KONNAI, S.; USUI, T.; IKEDA, M.; KOHARA, J.; HIRATA, T.; OKADA, K.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Imbalance of tumor necrosis factor receptors during progression in bovine leukemia virus infection. **Virology**, v. 339, n. 2, p. 239-248, 2005.
- KONNAI, S.; USUI, T.; IKEDA, M.; KOHARA, J.; HIRATA, T.; OKADA, K.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Tumor necrosis factor-alpha up-regulation in spontaneously proliferating cells derived from bovine leukemia virus-infected cattle. **Arch. Virol.**, v. 151, n. 2, p. 347-360, 2006.
- KONNAI, S.; USUI, T.; OHASHI, K.; ONUMA, M. The rapid quantitative analysis of bovine cytokine genes by real-time RT-PCR. **Vet. Microbiol.**, v. 94, n. 4, p. 283-294, 2003b.
- LALOV, C. [Criteria in the evaluation of blood picture for the diagnosis of bovine leukosis]. **Arch. Exp. Veterinarmed.**, v. 25, n. 4, p. 741-745, 1971.
- LAVANYA, M.; KINET, S.; MONTEL-HAGEN, A.; MONGELLAZ, C.; BATTINI, J. L.; SITBON, M.; TAYLOR, N. Cell surface expression of the bovine leukemia virus-binding receptor on B and T lymphocytes is induced by receptor engagement. **J. Immunol.**, v. 181, n. 2, p. 891-898, 2008.

- LEE, J.; KIM, Y.; KANG, C. S.; CHO, D. H.; SHIN, D. H.; YUM, Y. N.; OH, J. H.; KIM, S. H.; HWANG, M. S.; LIM, C. J.; YANG, K. H.; HAN, K. Investigation of the bovine leukemia virus proviral DNA in human leukemias and lung cancers in Korea. **J. Korean Med. Sci.**, v. 20, n. 4, p. 603-606, 2005.
- LETESSON, J. J.; MAGER, A.; MAMMERICKX, M.; BURNY, A.; DEPELCHIN, A. B cells from bovine leukemia virus- (BLV) infected sheep with hematological disorders express the CD5 T cell marker. **Leukemia**, v. 4, n. 5, p. 377-379, 1990.
- LETESSON, J. J.; VAN DEN BROECKE, A.; MARBAIX-CLEUTER, Y.; DELCOMMENNE, M.; MAGER, A.; MAMMERICKX, M.; BURNY, A.; DEPELCHIN, A. FACS analysis of bovine leukemia virus (BLV)-infected cell lines with monoclonal antibodies (mAbs) to B cells and to monocytes/macrophages. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 27, n. 1/3, p. 207-213, 1991.
- LEVKUT, M.; PONTI, W.; SOLIGO, D.; QUIRICI, N.; ROCCHI, M.; LAMBERTENGHI DELILIERIS, G. Expression and quantification of IgG and IgM molecules on the surface of lymphocytes of cattle infected with bovine leukaemia virus. **Res. Vet. Sci.**, v. 59, n. 1, p. 45-49, 1995.
- 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.
- LEWIN, H. A. Disease resistance and immune response genes in cattle: strategies for their detection and evidence of their existence. **J. Dairy Sci.**, v. 72, n. 5, p. 1334-1348, 1989.
- LEWIN, H. A.; BERNOCO, D. Evidence for BoLA-linked resistance and susceptibility to subclinical progression of bovine leukaemia virus infection. **Anim. Genet.**, v. 17, n. 3, p. 197-207, 1986.
- LEWIN, H. A.; RUSSELL, G. C.; GLASS, E. J. Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. **Immunol. Rev.**, v. 167, p. 145-158, 1999.
- LEZIN, A.; OLINDO, S.; BELROSE, G.; SIGNATE, A.; CESAIRE, R.; SMADJA, D.; MACALLAN, D.; ASQUITH, B.; BANGHAM, C.; BOUZAR, A.; GILLET, N.; DEFOICHE, J.; FLORINS, A.; VERLAETEN, O.; BURNY, A.; WILLEMS, L. Gene activation therapy: from the BLV model to HAM/TSP patients. **Front. Biosci. (Schol Ed.)**, v. 1, p. 205-215, 2009.
- LORENZ, R. J.; STRAUB, O. C. Studies on the validity of the leukosis key for breeds other than Holstein-Friesian cattle. **Zentralbl. Veterinarmed. B**, v. 23, n. 1, p. 1-26, 1976.
- LORENZ, R. J.; STRAUB, O. C. The epidemiology of enzootic bovine leukosis. In: BURNY, A.; MAMMERICKX, M. (Ed.). **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus**. Boston: Martinus Nijhoff, 1987. p. 51-68.
- LUNDBERG, P.; SPLITTER, G. A. gammadelta(+) T-Lp6phocyte cytotoxicity against envelope-expressing target cells is unique to the alymphocytic state of bovine leukemia virus infection in the natural host. **J. Virol.**, v. 74, n. 18, p. 8299-8306, 2000.
- LYSONS, R. Positive enzootic bovine leukosis serology results in calves from feeding a colostrum substitute. **Vet. Rec.**, v. 166, n. 3, p. 88, 2010.
- MARSHAK, R. R.; ABT, D. A. The epidemiology of bovine leukosis. **Bibl. Haematol.**, v. 30, p. 166-182, 1968.
- MATEO, L.; GARDNER, J.; SUHRBIER, A. Delayed emergence of bovine leukemia virus after vaccination with a protective cytotoxic T cell-based vaccine. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 17, n. 15, p. 1447-1453, 2001.

- MATOS, P. F.; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. [Enzootic bovine leukosis: prevalence of seric antibodies on dairy cows breed at Bahia and comparasion between results of Elisa tests and the ágar gel immunodiffusion tests]. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 42, n. 3, p. 171-179, 2005.
- MEAS, S.; RUAS, J.; FARIAS, N. A.; USUI, T.; TERAOKA, Y.; MULENGA, A.; CHANG, K. S.; MASUDA, A.; MADRUGA, C. R.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle. **Jpn. J. Vet. Res.**, v. 50, n. 1, p. 9-16, 2002a.
- MEAS, S.; USUI, T.; OHASHI, K.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds. **Vet. Microbiol.**, v. 84, n. 3, p. 275-282, 2002b.
- MEIRELLES, C.; DITTRICH, T.; CIPRIANO, F.; RÜDIGER, D. O. Evolução da soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina em um rebanho bovino leiteiro universitário. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 671-678, 2009.
- MEIROM, R.; MOSS, S.; BRENNER, J. Bovine leukemia virus-gp51 antigen expression is associated with CD5 and IgM markers on infected lymphocytes. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 59, n. 1/2, p. 113-119, 1997.
- MEIROM, R.; MOSS, S.; BRENNER, J.; HELLER, D.; TRAININ, Z. Levels and role of cytokines in bovine leukemia virus (BLV) infection. **Leukemia**, v. 11, n. 3, p. 219-220, 1997.
- 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.
- MIRSKY, M. L.; DA, Y.; LEWIN, H. A. Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in individual cells. **PCR Methods Appl.**, v. 2, n. 4, p. 333-340, 1993.
- 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.; DIMMOCK, C. K.; EAVES, F. W.; BRUYERES, A. G.; COWLEY, J. A.; WARD, W. H. Control of bovine leukaemia virus transmission by selective culling of infected cattle on the basis of viral antigen expression in lymphocyte cultures. **Vet. Microbiol.**, v. 39, n. 3/4, p. 323-333, 1994.
- MONKE, D. R.; ROHDE, R. F.; HUESTON, W. D.; MILBURN, R. J. Estimation of the sensitivity and specificity of the agar gel immunodiffusion test for bovine leukemia virus: 1,296 cases (1982-1989). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 200, n. 12, p. 2001-2004, 1992.
- MORRIS, S. D.; BRYSON, N. R.; DE WAAL, D. T.; MATTHEE, O.; DU PREEZ, E. R.; VAN VUUREN, M.; KADISH, E. S. The possible role of two common three-host ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma hebraeum*, in the transmission of bovine leukosis virus. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v. 67, n. 3, p. 148-150, 1996.
- MURAKAMI, K.; SENTSU, H.; INOSHIMA, Y.; INUMARU, S. Increase in gammadelta T cells in the blood of cattle persistently infected with bovine leukemia virus following administration of recombinant bovine IFN-gamma. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 101, n. 1/2, p. 61-71, 2004.
- NAGAI, M.; BRENNAN, M. B.; SAKAI, J. A.; MORA, C. A.; JACOBSON, S. CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1858-1861, 2001.

NAGY, D. W.; TYLER, J. W.; KLEIBOEKER, S. B. Decreased periparturient transmission of bovine leukosis virus in colostrum-fed calves. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 21, n. 5, p. 1104-1107, 2007.

NAGY, D. W.; TYLER, J. W.; KLEIBOEKER, S. B. Enhanced periparturient transmission of bovine leukosis virus in colostrum-deprived calves. **J. Vet. Int. Med.**, v. 20, n. 3, p. 724-725, 2006.

NAGY, D. W.; TYLER, J. W.; KLEIBOEKER, S. B.; STOKER, A. Use of a polymerase chain reaction assay to detect bovine leukosis virus in dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 222, n. 7, p. 983-985, 2003.

NAGY, 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. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 220, n. 11, p. 1681-1684, 2002.

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

OIE. **Health Standards**. Terrestrial Animal Health Code 2003. Enzootic bovine leukosis.[s.l.: s.n., 2003]. Disponível em: <<http://www.oie.int>>. Acesso em: 01 nov. 2009.

OLDSTONE, M. B. Viral persistence: parameters, mechanisms and future predictions. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 111-118, 2006.

OLSON, C.; HOSS, H. E.; MILLER, J. M.; BAUMGARTENER, L. E. Evidence of bovine C-type (leukemia) virus in dairy cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 163, n. 4, p. 355-357, 1973.

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

PARODI, A. L. Pathology of enzootic bovine leukosis: comparison with the sporadic form. In: BURNY, A.; MAMMERICKX, M. (Ed.). **Enzootic bovine leukosis and bovine leukemia virus**. Boston: Martinus Nijhoff, 1987. p. 15-49.

PELZER, K. D. Economics of bovine leukemia virus infection. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v. 13, n. 1, p. 129-141, 1997.

PLATT, R.; COUTU, C.; MEINERT, T.; ROTH, J. A. Humoral and T cell-mediated immune responses to bivalent killed bovine viral diarrhea virus vaccine in beef cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 122, n. 1/2, p. 8-15, 2008.

POLLOCK, J. M.; WELSH, M. D. The WC1(+) gammadelta T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 89, n. 3/4, p. 105-114, 2002.

PORTETELLE, D.; BRUCK, C.; BURNY, A.; DEKEGEL, D.; MAMMERICKX, M.; URBAIN, J. Detection of complement-dependent lytic antibodies in sera from bovine leukemia virus-infected animals. **Ann. Rech. Vet.**, v. 9, n. 4, p. 667-674, 1978.

PYEON, D.; DIAZ, F. J.; SPLITTER, G. A. Prostaglandin E(2) increases bovine leukemia virus tax and pol mRNA levels via cyclooxygenase 2: regulation by interleukin-2, interleukin-10, and bovine leukemia virus. **J. Virol.**, v. 74, n. 12, p. 5740-5745, 2000.

PYEON, D.; O'REILLY, K. L.; SPLITTER, G. A. Increased interleukin-10 mRNA expression in tumor-bearing or persistently lymphocytotic animals infected with bovine leukemia virus. **J. Virol.**, v. 70, n. 8, p. 5706-5710, 1996.

PYEON, D.; SPLITTER, G. A. Interleukin-12 p40 mRNA expression in bovine leukemia virus-infected animals: increase in alymphocytosis but decrease in persistent lymphocytosis. **J. Virol.**, v. 72, n. 8, p. 6917-6921, 1998.

PYEON, D.; SPLITTER, G. A. Regulation of bovine leukemia virus tax and pol mRNA levels by interleukin-2 and -10. **J. Virol.**, v. 73, n. 10, p. 8427-8434, 1999.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.

RADKE, K.; GROSSMAN, D.; KIDD, L. C. Humoral immune response of experimentally infected sheep defines two early periods of bovine leukemia virus replication. **Microb. Pathog.**, v. 9, n. 3, p. 159-171, 1990.

RITTER, H. Hemotologic Diagnosis in Tumorous Leukemia in Cattle. **Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.**, v. 78, p. 166-169, 1965.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6. ed., São Paulo: 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. **Mem. Inst. Butantã**, v. 20, p. 329-335, 1947.

ROVNAK, J.; CASEY, J. W.; BOYD, A. L.; GONDA, M. A.; COCKERELL, G. L. Isolation of bovine leukemia virus infected endothelial cells from cattle with persistent lymphocytosis. **Lab. Invest.**, v. 65, n. 2, p. 192-202, 1991.

SAGATA, N.; IKAWA, Y. BLV and HTLV-I: their unique genomic structures and evolutionary relationship. **Princess Takamatsu Symp.**, v. 15, p. 229-240, 1984.

SAINI, S. S.; ALLORE, B.; JACOBS, R. M.; KAUSHIK, A. Exceptionally long CDR3H region with multiple cysteine residues in functional bovine IgM antibodies. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, n. 8, p. 2420-2426, 1999.

SARGEANT, J. M.; KELTON, D. F.; MARTIN, S. W.; MANN, E. D. Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. **Prev. Vet. Med.**, v. 31, n. 3/4, p. 211-221, 1997.

SAWIRES, S.; BIRNBAUM, N.; ABU-RADDAD, L.; SZEKERES, G.; GAYLE, J. Twenty-five years of HIV: lessons for low prevalence scenarios. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 51, n. 3, p. S75-882, 2009.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

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

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

SENTSUI, H.; MURAKAMI, K.; INOSHIMA, Y.; YOKOYAMA, T.; INUMARU, S. Anti-viral effect of recombinant bovine interferon gamma on bovine leukaemia virus. **Cytokine**, v. 16, n. 6, p. 227-231, 2001.

SHIMIZU, A.; SHIMIZU, N.; TANAKA, A.; JINNO-OUE, A.; ROY, B. B.; SHINAGAWA, M.; ISHIKAWA, O.; HOSHINO, H. Human T-cell leukaemia virus type I is highly sensitive to UV-C light. **J. Gen. Virol.**, v. 85, n. 8, p. 2397-2406, 2004.

SHUH, M.; BEILKE, M. The human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): new insights into the clinical aspects and molecular pathogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and tropical spastic paraparesis/HTLV-associated myelopathy (TSP/HAM). **Microsc. Res. Tech.**, v. 68, n. 3/4, p. 176-196, 2005.

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.

SOUZA, M.; AZEVEDO, M. S.; JUNG, K.; CHEETHAM, S.; SAIF, L. J. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. **J. Virol.**, v. 82, n. 4, p. 1777-1786, 2008.

STONE, D. M.; NORTON, L. K.; CHAMBERS, J. C.; MEEK, W. J. CD4 T lymphocyte activation in BLV-induced persistent B lymphocytosis in cattle. **Clin. Immunol.**, v. 96, n. 3, p. 280-288, 2000.

STONE, D. M.; NORTON, L. K.; MAGNUSON, N. S.; DAVIS, W. C. Elevated pim-1 and c-myc proto-oncogene induction in B lymphocytes from BLV-infected cows with persistent B lymphocytosis. **Leukemia**, v. 10, n. 10, p. 1629-1638, 1996.

STOTT, M. L.; THURMOND, M. C.; DUNN, S. J.; OSBURN, B. I.; STOTT, J. L. Integrated bovine leukosis proviral DNA in T helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. **J. Gen. Virol.**, v. 72, n. 2, p. 307-315, 1991.

TAKAHASHI, M.; TAJIMA, S.; TAKESHIMA, S. N.; KONNAI, S.; YIN, S. A.; OKADA, K.; DAVIS, W. C.; AIDA, Y. Ex vivo survival of peripheral blood mononuclear cells in sheep induced by bovine leukemia virus (BLV) mainly occurs in CD5- B cells that express BLV. **Microbes Infect.**, v. 6, n. 6, p. 584-595, 2004.

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

TEIFKE, J. P.; VAHLENKAMP, T. W. Detection of bovine leukaemia virus (BLV) in tissue samples of naturally and experimentally infected cattle. **Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.**, v. 121, n. 7/8, p. 263-269, 2008.

TEUTSCH, M. R.; LEWIN, H. A. Aberrant expression of immunoglobulin mRNA in bovine leukemia virus-infected cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 53, n. 1/2, p. 87-94, 1996.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 279, n. 6, p. 1005-1028, 2000.

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.

TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J. A.; DOHOO, I. R.; KEEFE, G. P.; HADDAD, J. P.; SCOTT, H. M.; WHITING, T. Risk factors associated with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis seropositivity in Canadian dairy cows and herds. **Prev. Vet. Med.**, v. 88, n. 1, p. 32-41, 2009.

TIWARI, A.; VANLEEUEWEN, J. A.; DOHOO, I. R.; KEEFE, G. P.; HADDAD, J. P.; TREMBLAY, R.; SCOTT, H. M.; WHITING, T. Production effects of pathogens causing bovine leukosis, bovine viral diarrhea, paratuberculosis, and neosporosis. **J. Dairy Sci.**, v. 90, n. 2, p. 659-669, 2007.

TRAININ, Z.; BRENNER, J.; MEIROM, R.; UNGAR-WARON, H. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 54, n. 1/4, p. 293-302, 1996.

UNGAR-WARON, H.; PAZ, R.; BRENNER, J.; YAKOBSON, B.; PARTOSH, N.; TRAININ, Z. Experimental infection of calves with bovine leukemia virus (BLV): an applicable model of a retroviral infection. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 67, n. 2, p. 195-201, 1999.

USUI, T.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Expression of tumor necrosis factor- α in IgM+ B-cells from bovine leukemia virus-infected lymphocytotic sheep. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 112, n. 3/4, p. 296-301, 2006.

USUI, T.; KONNAI, S.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Interferon- γ expression associated with suppression of bovine leukemia virus at the early phase of infection in sheep. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 115, n. 1/2, p. 17-23, 2007.

USUI, T.; KONNAI, S.; TAJIMA, S.; WATARAI, S.; AIDA, Y.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Protective effects of vaccination with bovine leukemia virus (BLV) Tax DNA against BLV infection in sheep. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 65, n. 11, p. 1201-1205, 2003.

VERNAU, W.; JACOBS, R. M.; VALLI, V. E.; HEENEY, J. L. The immunophenotypic characterization of bovine lymphomas. **Vet. Pathol.**, v. 34, n. 3, p. 222-225, 1997.

WEAVER, D. M.; TYLER, J. W.; VANMETRE, D. C.; HOSTETLER, D. E.; BARRINGTON, G. M. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 14, n. 6, p. 569-577, 2000.

WERLING, D.; SILEGHEM, M.; LUTZ, H.; LANGHANS, W. Effect of bovine leukemia virus infection on bovine peripheral blood monocyte responsiveness to lipopolysaccharide stimulation in vitro. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 48, n. 1/2, p. 77-88, 1995.

WILLEMS, L.; THIENPONT, E.; KERKHOF, P.; BURNY, A.; MAMMERICKX, M.; KETTMANN, R. Bovine leukemia virus, an animal model for the study of intrastrain variability. **J. Virol.**, v. 67, n. 2, p. 1086-1089, 1993.

WRATHALL, A. E.; SIMMONS, H. A.; VAN SOOM, A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected semen. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 247-274, 2006.

WU, D.; MURAKAMI, K.; MOROOKA, A.; JIN, H.; INOSHIMA, Y.; SENTSU, H. In vivo transcription of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency-like virus. **Virus Res.**, v. 97, n. 2, p. 81-87, 2003.

- WU, D.; TAKAHASHI, K.; MURAKAMI, K.; TANI, K.; KOGUCHI, A.; ASAHINA, M.; GORYO, M.; AIDA, Y.; OKADA, K. B-1a, B-1b and conventional B cell lymphoma from enzootic bovine leukosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 55, n. 1/3, p. 63-72, 1996.
- 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.
- XU, A.; VAN EIJK, M. J.; PARK, C.; LEWIN, H. A. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus. **J. Immunol.**, v. 151, n. 12, p. 6977-6985, 1993.
- YAKOBSON, B.; BRENNER, J.; UNGAR-WARON, H.; TRAININ, Z. Cellular immune response cytokine expression during the initial stage of bovine leukemia virus (BLV) infection determines the disease progression to persistent lymphocytosis. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 23, n. 3, p. 197-208, 2000.
- YAKOBSON, B.; BRENNER, J.; UNGAR-WARON, H.; TRAININ, Z. Short-termed expression of interleukin-12 during experimental BLV infection may direct disease progression to persistent lymphocytosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 64, n. 3, p. 207-218, 1998.
- YAN, X. J.; ALBESIANO, E.; ZANESI, N.; YANCOPOULOS, S.; SAWYER, A.; ROMANO, E.; PETLICKOVSKI, A.; EFREMOV, D. G.; CROCE, C. M.; CHIORAZZI, N. B cell receptors in TCL1 transgenic mice resemble those of aggressive, treatment-resistant human chronic lymphocytic leukemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, n. 31, p. 11713-11718, 2006.
- YIN, S. A.; MAKARA, M.; PAN, Y.; ISHIGURO, H.; IKEDA, M.; NUMAKUNAI, S.; GORYO, M.; OKADA, K. Relation between phenotype of tumor cells and clinicopathology in bovine leukosis. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 65, n. 5, p. 599-606, 2003.
- YOSHIKAWA, H.; YOSHIKAWA, T.; OYAMADA, T.; SASAKI, T.; KOYAMA, H.; TSUBAKI, S. Establishment and maintenance of bovine leukosis virus-free farm. **Kitasato Arch. Exp. Med.**, v. 65, n. 2/3, p. 137-141, 1992.
- ZANOTTI, M.; POLI, G.; PONTI, W.; POLLI, M.; ROCCHI, M.; BOLZANI, E.; LONGERI, M.; RUSSO, S.; LEWIN, H. A.; VAN EIJK, M. J. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. **Anim. Genet.**, v. 27, n. 5, p. 337-341, 1996.
- ZHAO, Y.; JACKSON, S. M.; AITKEN, R. The bovine antibody repertoire. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 30, n. 1/2, p. 175-186, 2006.

"O pessimista queixa-se do vento. O otimista espera que ele mude. O realista ajusta as velas."

Willian George Ward