

# Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina<sup>1</sup>

## Enzootic bovine leukosis and Bovine leukemia virus

Luis Álvaro Leuzzi Junior<sup>2</sup>; Alice Fernandes Alfieri<sup>3</sup>; Amauri Alcindo Alfieri<sup>3</sup>

**Resumo:** A Leucose Enzoótica Bovina é uma infecção viral amplamente disseminada em rebanhos bovinos de todo o mundo. Esta revisão tem por objetivo apresentar tópicos relacionados ao agente etiológico, à doença clínica e aos métodos de diagnóstico, controle e profilaxia da infecção.

**Palavras-chave:** Bovinos, Leucose Enzoótica Bovina, vírus da leucemia bovina.

**Abstract:** All over de World the Enzootic Bovine Leukosis is a important viral infection in cattle herds. This revision points out topics relative to the etiological agent, clinical signals, diagnosis methods, control and prophylaxis of the infection.

**Key words:** Enzootic Bovine Leukosis, Bovine leukemia virus, bovine.

### 1 Introdução

A leucose enzoótica bovina (LEB) é causada pelo vírus da leucemia bovina (BLV) e está disseminada nos rebanhos bovinos de todo o mundo (JOHNSON; KANEENE, 1992). A doença tem longo período de evolução e, freqüentemente, apresenta-se de forma inaparente, sendo o animal assintomático um importante transmissor do vírus. Até 30% dos animais infectados podem desenvolver linfocitose persistente (LP), envolvendo particularmente o aumento do número de linfócitos B (LB) circulantes, e 2 a 5% dos animais portadores podem desenvolver linfossarcomas de evolução fatal (FERRER, 1979).

A importância econômica da infecção pelo BLV é decorrente de vários fatores como: i) perdas na exportação para mercados que requerem animais livres da infecção; ii) custos com o diagnóstico e o tratamento das complicações dos animais com linfossarcomas; iii) descarte prematuro ou morte de animais, particularmente aqueles de alto potencial genético, devido à ocorrência de linfossarcoma, e iv) condenação de carcaças em frigoríficos com serviço de inspeção veterinária (DIGIACOMO, 1992b).

A infecção pelo BLV pode comprometer o sistema imunológico dos bovinos ocasionando, indiretamente, redução na produtividade. Devido à imunossupressão, e conseqüente ocorrência de infecções secundárias, os animais infectados podem ser descartados precocemente antes mesmo do aparecimento de qualquer sinal clínico relacionado com a LEB. Em rebanhos infectados com o BLV, quando comparados com rebanhos livres, a produção de leite é menor e a taxa de descarte é maior. Estes fatores, apesar de serem raramente

associados à LEB, aumentam os prejuízos econômicos determinados por esta virose para a pecuária bovina (TRAININ *et al.*, 1996).

### 2 Etiologia

O BLV pertence à família *Retroviridae*, sub-família *Oncovirinae*. A partícula viral, em culturas de leucócitos, mede de 90-120 nm de diâmetro e é constituída por um capsídeo icosaédrico, envelope lipoglicoproteico e genoma RNA fita simples de polaridade positiva (MURPHY *et al.*, 1999).

A inexistência de linhagens celulares que permitissem a replicação do BLV *in vitro* impossibilitaram, inicialmente, os estudos relativos à biologia molecular do vírus. Somente em 1974 o BLV pôde ser amplificado em células de baço fetal ovino (VAN DER MAATEN *et al.*, 1974). Em 1976, foi desenvolvida uma linhagem de células pulmonares de morcego (BLV-bat) que permitiu a replicação do BLV em altos títulos (GRAVES; FERRER, 1976).

A análise bioquímica do BLV demonstrou que o vírus é composto por várias proteínas, de diferentes massas moleculares, identificadas pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. A proteína presente em maior concentração no capsídeo viral tem massa molecular de, aproximadamente, 24.000D sendo denominada de p24 (GILDEN *et al.*, 1975).

As glicoproteínas, presentes no envelope dos retrovírus, possuem uma importante função biológica no ciclo de replicação por modularem a adsorção do vírus à célula alvo, determinando o tropismo e a especi-

<sup>1</sup> Apoio Financeiro: CNPq, CAPES, CPG/Uel

<sup>2</sup> Aluno do Programa de Pós-graduação (nível: Mestrado) em Sanidade Animal / Uel

<sup>3</sup> Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina. e-mail: <alfieri@uel.br>

ficidade viral. Em alguns retrovírus as glicoproteínas do envelope também estão envolvidas na indução de sincícios celulares (ALTANER *et al.*, 1993).

O envelope do BLV é transcrito a partir do DNA do provírus, sendo esta mensagem traduzida em uma proteína precursora do envelope (Pr<sup>72</sup>). Este precursor é processado na glicoproteína transmembrana (gp30) e em uma unidade de superfície, a glicoproteína 51 (gp51). A gp51 do envelope do BLV é responsável pela infectividade do vírus, sendo que a ligação da gp51 a um receptor específico na célula é a etapa inicial da infecção. A formação *in vitro* de células multinucleadas (sincícios) é o resultado da ligação da gp51 na membrana celular. O BLV pode ser neutralizado por anticorpos dirigidos contra a gp51, que também inibem a formação de sincícios (ALTANER *et al.*, 1993).

Anticorpos monoclonais, dirigidos contra a gp51 purificada, identificaram epítomos conformacionais e seqüenciais na molécula que foram denominados de epítomos F, G, H, e C. Estes anticorpos monoclonais foram capazes de neutralizar o BLV e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK *et al.*, 1982).

Além dos genes *gag*, *env* e *pol* que codificam as proteínas estruturais e aquelas com funções enzimáticas, o genoma do BLV possui uma região chamada de X, que contém pelo menos quatro genes. Entre eles, os genes Tax e Rex estão envolvidos, respectivamente, na regulação transcricional e pós-transcricional. Pela clonagem do RNAm correspondente, a partir de linfócitos infectados pelo BLV, foram identificados ainda dois outros genes, R3 e G4. Embora a função destes genes ainda seja desconhecida, eles parecem ser importantes na biologia do vírus, uma vez que a sua deleção restringe a propagação viral *in vivo* (KERKHOF, *et al.*, 1998).

### 3 Epidemiologia

A LEB foi descrita pela primeira vez no ano de 1871 na Alemanha. Considera-se que a Europa seja o berço da infecção e acredita-se que a doença tenha sua origem na região de Memel, situada na Prússia Oriental, movendo-se para o oeste com o passar dos anos. Após a segunda guerra mundial foram realizados numerosos relatos da LEB em praticamente todos os países da Europa Oriental. Animais importados da região do mar Báltico, no final do século 19, introduziram o vírus nos rebanhos bovinos dos Estados Unidos da América. Com a disseminação da infecção os rebanhos canadenses também foram comprometidos. No pós-guerra, a importação de animais destes dois países disseminou o BLV para o restante do mundo (LEISERING, 1871; FELDMAN, 1928; SCHOTTLER; SCHOTTLER, 1934; SORENSEN, 1961; JOHNSON; KANEENE, 1992). No Brasil a infecção foi primeiramente descrita por Rangel e Machado em 1943.

Uma das características da LEB é a alta morbidade. Em rebanhos infectados a prevalência da infecção pode alcançar taxas elevadas de 60 a 90% (JOHNSON; KANEENE, 1992).

Entretanto,

Uma revisão bibliográfica sobre a epidemiologia descritiva da LEB fornece informações de qualidade variável devido ao fato de que são raros os estudos epidemiológicos descritivos corretamente elaborados e de que tanto a doença quanto o agente etiológico, com exceção de alguns países, não são de notificação obrigatória (JOHNSON; KANEENE, 1992).

Burrige *et al.* (1981), utilizando o teste sorológico de imunodifusão em ágar-gel (IDAG), estudaram a prevalência da LEB no estado da Flórida (EUA) em 7768 soros de bovinos leiteiros com idade superior a 18 meses e em 4911 soros provenientes de bovinos de corte. Os resultados mostraram que 47,8% dos animais produtores de leite eram soropositivos enquanto que nos bovinos de corte apenas 6,7% dos animais apresentaram anticorpos para o BLV. Um estudo de prevalência de anticorpos para o BLV, empregando a técnica de IDAG, foi realizado em todo o rebanho leiteiro do estado de Michigan (EUA). O estado foi estratificado em distritos agrícolas e uma amostra proporcional do rebanho foi selecionada de cada distrito. Ao final, 66% dos animais com idade igual ou superior a dois anos de idade foi examinado. A prevalência encontrada nos 3.132 soros testados estava entre 24% e 36%. Em todos os sete distritos foram encontrados animais soropositivos. A prevalência não foi influenciada pelo número de casos de linfossarcomas, pelo tamanho do rebanho, ou pelo tipo de alojamento dos animais (KANEENE *et al.*, 1983).

No Canadá, um levantamento sorológico para o BLV foi realizado em 1.330 animais, pertencentes a 102 rebanhos leiteiros na região de Ontário. A prevalência individual da infecção, com base no teste IDAG, foi de 23%, com 69,6% de rebanhos com um ou mais animais positivos (SARGEANT *et al.*, 1997). Outro estudo envolvendo 998 animais de 268 propriedades, também da região de Ontário, encontrou uma soroprevalência para o BLV de 24,2% e 47% para animais e rebanhos, respectivamente (HEALD *et al.*, 1992).

Um estudo realizado na bacia leiteira de Mar y Sierra na província de Buenos Aires por Ghezzi *et al.* (1997), avaliou a presença de anticorpos anti-BLV em 4.203 amostras de leite provenientes de 73 rebanhos. Os resultados mostraram que apenas 31,5% dos rebanhos estavam livres da infecção. Estudos retrospectivos realizados no período de 1979 a 1981 na mesma região, mostraram que 95,6% dos rebanhos eram livres de infecção. Estes dados demonstram que a falta de adoção de medidas eficazes de controle faz com que a infecção se dissemine rapidamente.

Ainda na América do Sul, resultados de levantamentos sorológicos demonstram taxas de soroconversão para a LEB de 1,4% (corte) e 12,1% (leite) no Uruguai (FLORES *et al.*, 1992) e 45,3% na Colômbia (ALFONSO *et al.*, 1998).

No Brasil um inquérito sorológico realizado no estado

do Rio Grande do Sul envolvendo 1.038 vacas leiteiras de 135 propriedades de 18 municípios da região central do estado utilizou o teste IDAG para o diagnóstico da LEB. O estudo encontrou 20,7% de animais reagentes e 43,7% das propriedades contendo animais soropositivos (FLORES *et al.*, 1990). Outro estudo com maior abrangência, também realizado no Rio Grande do Sul, foi conduzido por Moraes (1996). Foram avaliadas, pela técnica de IDAG, 39.799 amostras de soro bovino de aptidão leiteira e de carne, provenientes de 4.200 propriedades rurais situadas em 172 municípios. Os exames sorológicos revelaram que 3.645 (9,2%) das amostras eram positivas. As análises estatísticas mostraram uma prevalência média para o estado em torno de 12% e de 29% de animais e rebanhos soropositivos, respectivamente.

No Estado do Paraná, durante a década de 80, Kantek *et al.*, (1983) analisaram pela técnica de IDAG o soro de 695 bovinos provenientes de 43 municípios atendidos pelas principais cooperativas e indústrias de laticínios do estado. Foram encontrados 144 (20,7%) animais e 75 (40,8%) rebanhos positivos.

No pólo regional de Londrina, Estado do Paraná, Carvalho *et al.* (1996) investigaram através da técnica de IDAG a presença de anticorpos específicos para a gp51 do BLV em 985 soros provenientes de 14 rebanhos. Neste levantamento foram avaliados tanto animais com aptidão para carne (raça nelore) quanto para leite (raça holandesa). Nenhum animal da raça nelore apresentou anticorpos específicos para o BLV. No entanto, 18,4% dos animais da raça holandesa foram considerados soropositivos com 83,3% dos rebanhos leiteiros contaminados. Em rebanhos produtores de leite do tipo B foram encontrados 27,4% dos animais soropositivos.

Ainda na região norte do Estado do Paraná, a soroprevalência da LEB em fêmeas com idade superior a 15 meses de rebanhos produtores de leite do tipo B, foi determinada pela técnica de IDAG. Foram avaliados 624 soros sanguíneos de animais pertencentes a 23 rebanhos de oito municípios. Foram identificados 254 (40,7%) animais soropositivos, com distribuição por todos os 23 (100%) rebanhos estudados (ALFIERI, dados não publicados).

Com o objetivo de determinar a frequência de ocorrência de animais soropositivos para o BLV, nos últimos anos foram realizados inquéritos sorológicos em vários estados brasileiros. O percentual de animais soropositivos variou consideravelmente entre os estudos: Acre (9,7%); Rondônia (23%); Bahia (16,1%); Ceará (9,1%); Goiás (35,9 %); Minas Gerais (28,4%); Rio de Janeiro (54,3%); São Paulo (49,2%) (ROMERO; ROWE, 1981; SANTOS *et al.*, 1985; ABREU *et al.*, 1990; TÁVORA, 1990; ANDRADE; ALMEIDA, 1991; ABREU, 1993; BIRGEL JR., *et al.*, 1995).

## 4 Transmissão

O conhecimento dos fatores de risco para a transmissão de uma doença infecciosa é

crucial para o seu controle e erradicação, principalmente quando alternativas como a imunização artificial for indisponível ou ineficaz. A opção atual para diminuir a incidência da infecção pelo BLV é atuar diretamente nas formas de transmissão, uma vez que a eliminação de todos os animais soropositivos de um rebanho normalmente não é uma alternativa aceita (JOHNSON; KANEENE, 1991b).

O BLV é um vírus que, *in vivo*, está sempre associado às células de defesa. Poucos materiais biológicos contêm concentrações altas de linfócitos o suficiente para serem infectantes. Portanto, a LEB não é transmitida tão facilmente quanto outras doenças infecciosas comuns à espécie bovina. No entanto, a soroprevalência da infecção pode alcançar 90%, especialmente em bovinos com aptidão leiteira (JOHNSON; KANEENE, 1991a).

Dimmock *et al.* (1991) estudaram a transmissão natural do BLV em rebanhos com aptidão leiteira e constataram que uma menor taxa de prevalência (até 22%) leva a uma menor incidência, sendo que a infecção apresentou tendência de disseminação rápida em rebanhos com maior número de animais soropositivos (acima de 42%) para o BLV.

A prevalência e a incidência da infecção são menores em animais jovens sendo que estes, quando positivos, provavelmente foram infectados pela via vertical. A incidência e a prevalência da LEB aumentam significativamente a partir de 16 a 24 meses de idade (JOHNSON; KANEENE, 1991a). Em bezerros, a infecção pós-natal pode ser atribuída principalmente à ingestão de colostro contaminado com o vírus. Assim, práticas de manejo podem influenciar na disseminação vertical do BLV (DIGIACOMO, 1992c).

Com o objetivo de estabelecer o potencial na transmissão do BLV foram estudados vários materiais biológicos como sangue, saliva, secreção nasal, lavado broncoalveolar, colostro, leite, urina, fezes, sêmen, fluidos de lavagem uterina e de embriões. Foi observado que, em condições normais, devido à grande concentração de componente celular, a transmissão pelo sangue é muito mais freqüente do que pelo colostro e leite (JOHNSON; KANEENE, 1992).

### 4.1 Transmissão horizontal

O contato físico prolongado de bezerros susceptíveis com animais portadores do vírus; o consumo de água contaminada com sangue infectado e a inoculação de ovelha com saliva de animais soropositivos para o BLV não resultaram na transmissão da infecção. A infecção de ovinos com o BLV pode ser realizada pela inoculação subcutânea de uma suspensão de linfócitos purificados, isolados a partir de bovinos infectados. A dose infectante mínima foi de  $10^3$  linfócitos, equivalente ao número de células presentes em aproximadamente 0,1  $\mu$ L de sangue (DIMMOCK *et al.*, 1991).

Os procedimentos que envolvem a transferência de um pequeno volume de sangue também têm um grande

potencial para transmitir a infecção. Por este motivo, a principal fonte de infecção do BLV para os bovinos é a transmissão iatrogênica por agulha, material cirúrgico, luva de palpação, tatuador ou qualquer outro procedimento que possa transmitir linfócitos de um animal para o outro (DIMMOCK *et al.*, 1991).

O contágio (animal-animal) pode ocorrer de forma natural, mas requer um íntimo e prolongado contato físico, uma vez que animais separados por mais de dois metros de distância não transmitem a infecção (STRAUB, 1978). Porém, foi observada uma transmissão facilitada em animais mantidos confinados durante o inverno (WILESMITH, 1980). Considerando que uma pequena quantidade de sangue pode ser transferida durante a cópula, a reprodução por monta natural também pode ser uma via de infecção (WHITTIER, 1990).

Insetos hematófagos podem alternar as alimentações em diferentes hospedeiros. Esta situação proporciona uma ampla oportunidade para que vetores possam assim transmitir agentes infecciosos. A transmissão de qualquer agente infeccioso por vetores hematófagos depende: i) do número de picadas; ii) da quantidade de sangue retida no aparelho bucal do inseto após a alimentação; iii) da infecciosidade do doador; iv) da suscetibilidade dos animais receptores e v) dos hábitos alimentares do vetor. Conforme o tipo de criação dos bovinos, principalmente aqueles que proporcionam uma maior proximidade entre os animais, os insetos hematófagos podem atuar como via de infecção do BLV (JOHNSON; KANEENE, 1991b).

Hasselschwert *et al.* (1993) compararam bezerros de rebanhos leiteiros e de corte quanto à suscetibilidade à infecção pelo BLV pela transmissão através da mosca do cavalo (*Tabanus fuscicostatus hine*). A transmissão ocorreu pela alimentação de moscas em uma vaca soropositiva com LP. Os insetos foram posteriormente transferidos para 21 bezerros (11 de corte e 10 leiteiros). Os resultados indicaram que a suscetibilidade à transmissão do BLV através de tabanídeos é equivalente em animais de ambas as aptidões. A diferença na prevalência, previamente observada entre as raças, pode ser devido às práticas diferenciadas de manejo.

Diversos estudos realizados em materiais biológicos de importância na reprodução como sêmen, óvulos, ou embriões de bovinos infectados, indicam que estes materiais dificilmente são contaminados pelo BLV e, conseqüentemente, não têm importância epidemiológica na transmissão. Vários estudos com sêmen, provenientes de animais soropositivos para o BLV, concluíram que a infecção não é transmitida para ovinos inoculados experimentalmente. A falta da transmissão ocorreu mesmo quando a presença do BLV no sêmen foi confirmada por técnicas virológicas (DIGIACOMO, 1992a).

O risco da transmissão do BLV pelo exame de palpação retal foi acompanhado em um rebanho comercial de aptidão leiteira, por um período de 22 meses. Animais soronegativos e soropositivos, em idade de reprodução, foram divididos aleatoriamente em dois

grupos. No grupo 1, a palpação retal foi realizada de forma rotineira, e após a palpação de um animal soropositivo para o BLV não houve mudança da luva. No grupo 2, a palpação aconteceu de forma semelhante com a exceção de que a luva era trocada após o uso em cada animal. Para determinar o número de novas infecções, oito testes sorológicos foram conduzidos durante os 22 meses de estudo que resultaram na identificação de 31 animais que se tornaram soropositivos. Destes, 24 pertenciam ao grupo 1 e sete ao grupo 2. O risco relativo para a soroconversão ao BLV foi determinado entre os dois grupos. Vacas palpadas sem a mudança de luva tiveram uma chance de 2,8 vezes maior de se infectarem. Este estudo confirmou que a palpação retal, sem uma prévia troca de luva, pode ser um importante fator de risco na transmissão da LEB. Nesta situação, para elaborar um programa de controle da LEB, o potencial de transmissão pela palpação retal deve ser considerado (DIVERS *et al.*, 1995).

## 4.2 Transmissão vertical

A transmissão vertical da LEB pode ocorrer pela via uterina ou mesmo oral, através da ingestão de colostro e leite contendo linfócitos contaminados com o BLV. A transmissão do BLV no período pré-natal, pela via uterina, freqüentemente ocorre após o primeiro trimestre de gestação em até 8% das gestações de animais soropositivos. As vacas com alta concentração de vírus e baixo título de anticorpos podem transmitir a infecção ao feto. Por outro lado, fêmeas com baixa concentração de vírus e um alto título de anticorpos, proporcionam transferência passiva de imunidade que permanece por alguns meses (JACOBSEN, 1983).

A técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR), para a identificação do genoma do BLV, foi padronizada para investigar a taxa de transmissão intra-uterina. A presença de anticorpos no soro e do DNA do provírus do BLV em linfócitos foi avaliada em 43 bezerros, no momento do nascimento e aos seis meses de idade. Ao nascer, 36 bezerros eram BLV-negativos e três BLV-positivos concomitantemente por sorologia e por PCR. Em quatro animais foi observada uma falta de correlação entre os métodos de diagnóstico. Em particular, dois bezerros eram DNA-positivos e anticorpo-negativos para o BLV e outros dois tiveram resultados opostos. Aos seis meses de idade, quando o padrão imunológico reflete o estado da resposta imune do animal, independente de anticorpos maternos, todos os bezerros DNA-negativos para o BLV ao nascimento, mesmo com sorologia positiva (n=38), apresentaram resultados negativos para ambos os testes. Porém, os animais DNA-positivos ao nascimento (n=5), apresentaram anticorpos aos seis meses. Todos os bezerros infectados ao nascimento nasceram de animais com LP, indicando que este estado pode representar um fator associado com a infecção do BLV no útero (AGRESTI *et al.*, 1993).

Na Califórnia (EUA), um estudo envolvendo 143 bezerros nascidos de vacas infectadas foi conduzido com o objetivo de avaliar possíveis fatores associados

com a infecção uterina ou durante o período perinatal. As infecções ocorreram em 4.8% dos casos e estavam associadas com linfocitose materna (>12.000 cels/ $\mu$ L) ou a bezerras nascidas de vacas com linfossarcoma. Não foi encontrada correlação entre a infecção pré e perinatal com a presença de anticorpos para a proteína p24 (LASSAUZET *et al.*, 1991).

Como o BLV pode ser transmitido verticalmente através do leite e do colostro, a presença do vírus em células epiteliais mamárias foi investigada por imunohistoquímica e PCR. Foram utilizadas culturas de células epiteliais de 28 vacas soropositivas. Evidências moleculares da presença do BLV foram encontradas nas células de 20 animais. Estes resultados sugerem que, além de apresentar um tropismo celular mais amplo do que previamente descrito, o BLV é capaz de infectar e expressar, *in vivo*, antígenos virais em epitélio glandular (BUEHRING *et al.*, 1994).

## 5 Patogenia e Sinais Clínicos

A LEB caracteriza-se por um curto período de viremia pós-infecção, seguido por um longo período de latência antes do aparecimento de sinais clínicos. Após um intervalo de 10 a 12 dias, partículas virais estão presentes na corrente sanguínea induzindo uma resposta imune humoral com a produção de anticorpos específicos para as proteínas virais p24 e gp51 (PORTETELLE *et al.*, 1978).

A maioria dos animais infectados permanece assintomática por longos períodos de tempo. Posteriormente alguns animais, em média 30% dos infectados, podem apresentar aumento no número de linfócitos B circulantes, caracterizando um quadro de linfocitose persistente, enquanto que outros (2 a 5%) podem desenvolver linfossarcomas (BUEHRING *et al.*, 1994; DOMENECH *et al.*, 2000). Uma das características dos animais infectados pelo BLV é a produção persistente de anticorpos, sugerindo uma constante (BURNY *et al.*, 1988) ou periódica (HEENEY *et al.*, 1992) estimulação do sistema imunológico por antígenos virais.

Os sinais clínicos observados na LEB são determinados, em grande parte, pela localização dos linfossarcomas. O aumento de linfonodos superficiais pode ser comum, mas esta hiperplasia pode também ocorrer apenas em tecidos linfóides viscerais. Ocorre invasão freqüente do sistema digestório, sendo comum no abomaso, causando obstruções ou úlceras que podem manifestar-se clinicamente como anorexia, timpanismo recorrente e perda de peso. Neoplasias localizadas na medula espinhal originam perturbações neurológicas como paralisia de membros posteriores, e casos de falência cardíaca em bovinos são freqüentemente associados a linfossarcomas no miocárdio (JOHNSON; KANEENE, 1991a).

Os linfossarcomas podem ainda ser encontrados no útero, rins e olhos (exoftalmia). Na cavidade abdominal, podem ser identificados através da palpação retal. Porém, se a patologia está restrita a órgãos ou linfonodos

viscerais o diagnóstico pode ser extremamente difícil. Os linfossarcomas são encontrados com maior frequência em animais entre quatro e oito anos de idade onde a doença é geralmente fatal. Nos casos avançados, os animais com linfossarcoma que são enviados ao abate, em estabelecimento com serviço de inspeção veterinária, poderão ter parte ou toda a carcaça condenada (MILLER; VAN DER MAATEN, 1982).

Para avaliar o potencial oncogênico dos produtos dos genes R3 e G4, Kerkhofs *et al.* (1998) analisaram a habilidade do BLV deletado em imortalizar e/ou transformar fibroblastos primários de embrião de camundongo. Neste ensaio, apenas a proteína codificada pelo gene G4 mostrou potencial oncogênico *in vitro*. Para estender estas observações a modelos *in vivo*, os autores também estudaram a patologia induzida pelo BLV recombinante. Vírus com mutações em G4 ou em R3 e G4 foram inoculados em ovelhas. A propagação viral, avaliada por PCR semiquantitativo, mostrou-se reduzida quando foram deletados os genes R3 e G4. Além destes resultados os autores também apresentaram os achados de uma pesquisa clínica, envolvendo 39 ovelhas infectadas com seis diferentes estirpes recombinantes do BLV. Em um período de 40 meses, 83% das ovelhas infectadas com o tipo selvagem do vírus desenvolveram linfossarcoma e/ou leucemia. Em contraste, nenhuma das 13 ovelhas infectadas com vírus mutante, apenas em G4 ou em ambos os genes R3 e G4, desenvolveu a doença. Os autores concluem que além de potencial oncogênico *in vitro*, o gene G4 também é requerido para patogênese *in vivo*.

Estirpes do BLV com deleção no gene Tax perdem a capacidade de induzir a imortalidade em células primárias *in vitro*, mas não *in vivo*, quando inoculadas em ovinos, indicando que outros genes (ex. G4) além do gene TAX são causadores de oncogênese (TWIZERE *et al.*, 2000).

A exemplo de outros retrovírus como o vírus da imunodeficiência humana-1 e o vírus de imunodeficiência felina as células da linhagem monocítica atuam como reservatório para o BLV, favorecendo desta forma o longo período de latência viral. O cultivo de monócitos e de macrófagos ovinos e bovinos, juntamente com células de linhagem permanentemente infectadas pelo BLV (rim fetal ovino e BLV-bat), irradiadas ou tratadas com mitomicina C para inibir a multiplicação viral, confirma o tropismo do BLV por estes fagócitos. O cultivo celular mostra que monócitos jovens, e conseqüentemente menos diferenciados, apresentam vacuolização, lise celular, alterações na membrana, freqüente apoptose e presença do vírus em fase de brotamento. Já os macrófagos mais diferenciados mostram poucas alterações microscópicas. Entretanto, a proteína p24 e seus precursores são facilmente identificados por *Western blotting*. A presença da gp51 nestas células pode ser confirmada pelo teste de formação de sincício (DOMENECH *et al.*, 2000).

Com o objetivo de estudar os mecanismos que podem desencadear a linfocitose persistente induzida pelo BLV, Schwartz-Cornil *et al.* (1997) compararam a

capacidade de sobrevivência de células B e a atividade do ciclo celular em células mononucleadas de sangue periférico (PBMCs) de ovinos. Os animais pertenciam a três grupos: I) animais com linfocitose persistente [LP]; II) animais soropositivos assintomáticos; e III) animais soronegativos, constituindo o grupo controle. Os linfócitos B originados dos animais do grupo I apresentaram uma menor taxa de apoptose espontânea (29%), quando comparados com os grupos II (42%) e III (57%). A síntese do capsídeo viral foi encontrada principalmente entre as células B sobreviventes. A porcentagem de linfócitos B produtores de capsídeo viral foi correlacionada com a sobrevivência destas células, indicando que a replicação do BLV pode promover proteção contra a morte celular. A análise do ciclo celular em PBMCs de ovinos, revelou uma proporção ligeiramente aumentada de células B em fase "S" do ciclo celular, quando comparada aos controles. Segundo os autores, estes dados sugerem que a proliferação celular induzida pelo BLV e a maior sobrevivência das células B estejam envolvidas com a fase de LP encontrada em infecções pelo BLV em ovinos.

Atualmente existem evidências de que a expressão do BLV por um linfócito infectado aumenta a sobrevivência desta célula por estacionar o ciclo celular em G0/G1. Esta ação atrasa a apoptose fisiológica que, na ausência de estímulos externos, ocorre na fase G2. O BLV pode ainda promover a proliferação de linfócitos B não infectados devido à ação de proteínas virais em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Esta ação aumenta os níveis de interleucina 2 (IL2) que é a interleucina responsável pela proliferação do LB. Esta estratégia viral garante o sucesso da infecção por aumentar a produção de partículas virais, prolongando a vida da célula infectada. Paralelamente, a proliferação de LB não infectados aumenta a população de células alvo. O conjunto destes efeitos leva o animal a apresentar o quadro de LP, sendo esta a principal via de transmissão do vírus aos animais não infectados (STONE *et al.*, 2000).

A seqüência do provírus do BLV não é detectada em linfócitos de bovinos soropositivos e assintomáticos, indicando que menos de 5% da população de linfócitos abriga o genoma viral. Contudo, de 25 a 35% das células de um animal com linfocitose persistente apresentam o provírus (KETTMANN *et al.*, 1980 e 1981).

## 6 Imunologia

Durante os últimos vinte anos, estudos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de bovinos revelaram um quadro detalhado da organização genética e função dos genes dentro deste sistema. Análises bioquímica e sorológica dos antígenos de superfície celular de leucócitos, proporcionaram a primeira evidência do grande polimorfismo dos genes MHC em bovinos e em outras espécies de ruminantes. O MHC bovino foi denominado de antígeno leucocitário bovino (BoLA). Os produtos dos genes do MHC classe I e classe II, presentes em ruminantes, processam peptídeos respectivamente para os linfócitos T citotóxicos (CD8) e T auxiliares (CD4).

As moléculas do MHC de ruminantes funcionam de uma maneira semelhante à de humanos e de camundongos. Os estudos funcionais do MHC indicam uma base molecular para várias associações com doenças infecciosas. Porém os mecanismos imunogenéticos envolvidos nestas associações necessitam ser melhor estudados (AMILLS *et al.*, 1998).

Uma forte relação entre o polimorfismo dos antígenos BoLA e a resistência ao BLV vem sendo estabelecida. O gene DRB3 está associado com a resistência à LP. Acredita-se que estes alelos (DRB3) influenciem o tipo de resposta imune (Ta1/Ta2) induzida frente aos peptídeos do BLV. Animais geneticamente resistentes apresentam uma resposta Ta1, resultando em uma forte e precoce resposta inflamatória (MIRSKY *et al.*, 1996).

A influência dos antígenos BoLA na progressão subclínica da infecção pelo BLV foi investigada em 41 fêmeas bovinas provenientes de dois rebanhos na Itália. Todos os animais eram soropositivos para o BLV e 22 apresentavam o quadro de LP. Os resultados confirmaram a associação de quatro haplótipos específicos (DQA\*3A, DQB\*3A, DRB2\*2A e DRB3.2\*11) como um fator de resistência para a LP, bem como determinaram que outros quatro haplótipos (DQA\*12, DQB\*12, DRB2\*3A e DRB3.2\*8) correspondem a um fator de risco para progressão da LP (ZANOTTI *et al.*, 1996).

Há evidência de que linfócitos CD4 ativado durante a infecção pelo BLV promovem o desenvolvimento da LP. Ainda não está totalmente esclarecida a forma como os linfócitos CD4 são ativados através da infecção pelo BLV. Foi observado que linfócitos T de bovinos com LP proliferam na presença de células mononucleadas irradiadas e autólogas do sangue periférico. No entanto, nenhuma proliferação foi observada em culturas de células de animais soropositivos sem LP. A proliferação requereu contato direto entre as células, mas não foi associada com a expressão de proteína viral ou inibida através de anticorpos contra o BLV. Estas observações e a magnitude da resposta proliferativa sugerem que a ativação seja policlonal e envolva mecanismos diferentes da ativação antígeno-específica causada pelo BLV (STONE *et al.*, 2000).

A análise, pela técnica de RT-PCR competitiva, para detectar a expressão do RNAm para o interferon-gama (INF $\gamma$ ), característico de uma resposta celular, foi realizada em bovinos experimentalmente infectados com o BLV. Os resultados mostraram, em animais que desenvolveram LP, aumento da síntese de INF $\gamma$  durante a terceira e quarta semanas após a infecção. Por outro lado, os animais soropositivos e assintomáticos expressaram altos níveis de RNAm para o INF $\gamma$  durante todas as semanas do experimento (1-24 semanas). Estes resultados sugerem que animais que possuem uma expressão precoce e prolongada de INF $\gamma$  podem retardar ou inibir o aparecimento da linfocitose (YAKOBSON *et al.*, 2000).

A L-selectina é um receptor relacionado com a adesão e migração de leucócitos através das células endoteliais. A expressão deste receptor foi determinada por imunofluorescência em PBMCs de origem bovina

por meio de um anticorpo monoclonal que reconhece L-selectina bovina. As células foram obtidas de animais saudáveis, e infectados com o BLV. No grupo de animais infectados havia animais com LP e assintomáticos. A porcentagem de PBMC que expressavam L-selectina foi menor nos portadores de LP quando comparada com animais assintomáticos e não infectados, e inversamente correlacionada com a contagem de linfócitos. A expressão de L-selectina em linfócitos B e T de animais infectados com o BLV exibiu uma redução de aproximadamente 50% quando comparada com animais livres de infecção. A infecção pelo BLV resulta em uma expressão diminuída da L-selectina em linfócitos podendo contribuir com a desestabilização do sistema imune do hospedeiro (DUSINSKY *et al.*, 2000).

Bovinos com LEB mostram uma redução no número de células produtoras de IgM no baço e em linfonodos. Bezerros experimentalmente infectados apresentaram baixos títulos de IgM e redução de linfócitos T no sangue periférico. A redução no número de células T foi notada, principalmente, em linfócitos com marcadores CD4<sup>+</sup>. Em bovinos naturalmente infectados pelo BLV foi observada a produção de anticorpos com reatividades estrutural ou biológica inadequadas (TRAININ *et al.*, 1996).

A resposta imune primária induzida pela vacinação com antígenos sintéticos mostrou-se deficiente em animais infectados pelo BLV. Também foi observada uma associação positiva entre a infecção pelo BLV e a falta de recuperação espontânea para a infecção por *Trichophyton verrucosum* (TRAININ *et al.*, 1996).

## 7 Diagnóstico

O diagnóstico da LEB é fundamental para o controle e a posterior erradicação da doença. O diagnóstico pode ser realizado por patologia clínica, pela observação do aumento persistente no número de linfócitos B (LP), e por sorologia, para a identificação de anticorpos específicos contra os antígenos do BLV. Após o isolamento e o cultivo do BLV, várias metodologias para a detecção de anticorpos foram desenvolvidas. As técnicas mais comumente utilizadas são a imunodifusão em ágar-gel (IDAG), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o radioimunoensaio (RIA). O objetivo primário destes métodos sorológicos é a identificação de bovinos infectados com o BLV, e não o diagnóstico da LP ou do linfossarcoma. A interpretação dos resultados sorológicos baseia-se na suposição de que o animal com infecção pelo BLV permanece portador do vírus por toda a vida e, conseqüentemente, será sempre soropositivo (EVERMANN, 1992).

O teste de indução de formação de sincício é a técnica utilizada em cultura de células infectadas com o BLV e baseia-se na habilidade da gp51, presente no envelope viral, em induzir a fusão celular. Além da sua utilidade para investigações em virologia básica, esta técnica pode ser empregada para a detecção do BLV em linfócitos de animais infectados. Por não sofrer a interferência de anticorpos colostrais, o teste de indução

de formação de sincício é especialmente útil na identificação de bezerros recém-nascidos, infectados verticalmente (FERRER; DIGILO, 1976).

Miller e Van Der Maaten (1976 e 1977) utilizaram a gp51 no desenvolvimento do teste de imunodifusão em ágar-gel (IDAG) para o diagnóstico sorológico da infecção pelo BLV em bovinos. Atualmente outras técnicas sorológicas estão disponíveis, porém a praticidade, o baixo custo e a especificidade tornaram a imunodifusão o teste mais amplamente utilizado para o diagnóstico da LEB.

Um estudo para comparar as técnicas de IDAG e ELISA indireto para o diagnóstico do BLV foi realizado, utilizando como teste confirmatório o *Western blotting* (WB). A especificidade de ambos os testes foi semelhante à obtida no WB, porém, a técnica de ELISA mostrou maior sensibilidade quando comparada à IDAG. Para as técnicas de ELISA e de WB a proteína p24, presente no capsídeo do BLV, é o antígeno mais importante. Por outro lado, as glicoproteínas gp51 e gp30 do envelope viral, são de especial importância para a técnica IDAG. Além de sua maior sensibilidade, o teste de ELISA apresenta como vantagem adicional a possibilidade da análise de um grande número de amostras simultaneamente. A técnica de WB, por analisar a resposta humoral contra proteínas individuais do BLV, é mais útil em estudos de caracterização antigênica do vírus (DOLZ; MORENO, 1999).

Com o objetivo de avaliar as possíveis oscilações na resposta humoral em animais soropositivos para o BLV, Tekes (1994) acompanhou pelo teste de IDAG dois grupos de animais. O primeiro grupo composto por 97 bovinos foi avaliado durante dois anos. O segundo grupo, constituído por 28 vacas, foi observado durante o intervalo de 60 dias antes e 90 dias após o parto. Noventa e quatro animais pertencentes ao primeiro grupo apresentaram resultados soropositivos durante o período em que os animais estiveram soltos a pasto. Porém, quando confinados em sistema de argola, 26 animais tornaram-se negativos. No grupo em gestação, com a proximidade do parto, sete animais apresentaram resultados soronegativos pela IDAG sendo que três destes permaneceram negativos por mais de 60 dias. As variações deste grupo também foram demonstradas por ELISA, porém, nenhum dos animais forneceu resultado negativo por esta técnica demonstrando que o desempenho da técnica de IDAG pode ser prejudicado pelo manejo e pelo puerpério. Estas situações podem conduzir a um estado de imunossupressão que interfere no nível de produção de anticorpos. Estes resultados sugerem que, para os trabalhos de erradicação da LEB a técnica de ELISA é a mais indicada pela sua maior sensibilidade e praticidade.

A técnica de PCR para o diagnóstico do BLV em animais naturalmente infectados foi avaliada comparativamente com métodos sorológicos de ELISA e IDAG. A PCR apresentou maior sensibilidade fornecendo resultados positivos em taxas superiores a 10 e 17% aos métodos de ELISA e IDAG, respectivamente. A técnica de PCR também possibilita distinguir bezerros

infectados pelo BLV daqueles animais soropositivos devido a ingestão de anticorpos colostrais. Os autores sugerem que a prevenção da disseminação do BLV de um país para outro, utilizando-se apenas testes sorológicos é quase impossível (FECHNER *et al.*, 1996).

Os exames histopatológicos em bovinos com LEB revelam uma distribuição característica de tumores de acordo com a idade do animal. As lesões típicas no adulto aparecem geralmente em animais com idade superior a três anos. Nestes animais o desenvolvimento de tumores volumosos e nodulosos, localizados em serosas, tecido conjuntivo frouxo e em nódulos linfáticos sugerem neoplasias em áreas relacionadas ao sistema linfático. O envolvimento do baço e a infiltração de leucócitos no fígado estão presentes em casos em que observa-se a manifestação leucêmica em sangue periférico. Os casos de neoplasia em medula óssea são raros. Em animais jovens, até a idade de reprodução, a proliferação neoplásica apresenta-se tanto em órgãos hematopoéticos quanto em linfonodos, medula óssea, fígado, baço, timo e tonsilas palatinas. A lesão hepática é caracterizada pela proliferação neoplásica nas tríades do espaço porta. Os tumores causados pelo BLV em animais adultos são definidos como linfoma ou linfossarcoma. Já a leucemia linfocítica parece ser o termo mais apropriado para designar a neoplasia linfóide característica em animais jovens (YAMAMOTO *et al.*, 1982).

## 8 Profilaxia

Pelo fato de ainda não existir nenhum método de imunização eficaz, disponível comercialmente, para o controle da LEB as práticas de manejo, baseadas no conhecimento das formas de transmissão, são a única alternativa eficiente para o controle e erradicação da doença (SHIRLEY *et al.*, 1997).

A elaboração de um programa de controle para a LEB tem sempre como base o levantamento sorológico para a identificação dos animais sororeagentes. Na prática, estes exames devem observar alguns pontos importantes tais como: i) Testes sorológicos que são realizados em animais com idade inferior a seis meses, podem apresentar resultados falso-positivos devido à presença de anticorpos colostrais; ii) Para evitar resultados falso-negativos, amostras de soro de vacas devem ser analisadas, pelo menos, seis semanas antes e após o parto; iii) Possíveis alterações na resposta imunológica devido ao estresse ambiental ou decorrente do manejo podem interferir no teste IDAG fornecendo resultados falso-negativos (JOHNSON; KANEENE, 1991c; DIGIACOMO, 1992b; TEKES, 1994).

A eliminação de todos os animais soropositivos para o BLV de um rebanho é uma medida capaz de erradicar a infecção em poucos meses, mesmo em criações com alta taxa de prevalência. O primeiro programa oficial para o controle e erradicação da LEB foi estabelecido na Dinamarca, tendo início em 1959. Neste país, a doença tornou-se de comunicação obrigatória, e todos os animais adultos de rebanhos que apresentaram

casos incidentes de leucose foram submetidos a exames hematológicos. Os rebanhos soropositivos foram isolados e, com o pagamento de indenizações, procurou-se estimular a eliminação de todo o plantel. Esta política de erradicação continuou até 1982. Embora esta estratégia radical garanta rapidamente o controle da LEB, muitas vezes ela não pode ser adotada devido ao alto custo econômico, uma vez que em muitos rebanhos, principalmente na bovinocultura leiteira, a prevalência pode alcançar até 80% (DIGIACOMO, 1992b; JOHNSON; KANEENE, 1992).

Outra forma de controlar a LEB é manter os animais infectados na propriedade, prevenindo a transmissão iatrogênica, por fômites ou por vetores animados, através da adoção de medidas que evitem a transferência de células de um doador infectado para um animal soronegativo. O uso de colostro livre do BLV também é uma medida importante, prevenindo a transmissão vertical da infecção. A pasteurização (BAUMGARTNER *et al.*, 1976) ou o congelamento (VAN DER MAATEN, 1982) do colostro e do leite tem a capacidade de inativar a infectividade do BLV. Em rebanhos leiteiros os bezerras machos podem receber leite e colostro de doadores soropositivos uma vez que estes animais são precocemente descartados. Esta medida racionaliza a disponibilidade de colostro de boa qualidade para os animais que farão parte do plantel produtivo da propriedade. Os animais soropositivos devem ser identificados e marcados, deste modo as práticas de manejo podem ser realizadas separadamente, evitando a disseminação iatrogênica da infecção. O ideal é a separação total dos animais em lotes infectados e livres do BLV. O controle da LEB por estas medidas, embora mais demorado, produz resultados satisfatórios, reduzindo a incidência da doença por bloquear a transmissão, evitando novas contaminações. A médio prazo, a medida em que os animais soropositivos forem substituídos por animais jovens, não portadores da infecção pelo BLV, a prevalência da infecção também será reduzida (JOHNSON; KANEENE, 1991c; DIGIACOMO, 1992b; SHIRLEY *et al.*, 1997).

Uma vacina recombinante, expressando integralmente o envelope do BLV, foi desenvolvida e avaliada em ovinos. A resposta imune induzida por este imunógeno recombinante protegeu os animais contra a infecção experimental. Neste estudo o envolvimento da imunidade celular ficou fortemente evidenciado. A vacinação de animais soropositivos para o BLV com a mesma vacina suprimiu, significativamente, a replicação viral. Estes dados sugerem que o desenvolvimento de vacinas eficazes contra os retrovírus devem enfatizar uma forte resposta imunecelular. Vacinas que possuam esta característica poderão, não apenas, ser utilizadas para fins profiláticos mas também com propósitos terapêuticos (SUGIMOTO *et al.*, 1994).

As pesquisas para o desenvolvimento de uma vacina para o controle da LEB continuam avançando. Recentemente os genes que codificam a gp51 e a gp30, presentes no envelope do BLV, foram clonados em citomegalovírus humano. Esta vacina foi testada em bovinos que, poste-



riormente, foram desafiados com o BLV. A aplicação da vacina foi realizada pela via intramuscular e gerou uma forte resposta imune celular. Sete entre dez animais vacinados com o DNA resistiram ao desafio com linfócitos infectados (BRILLOWSKA *et al.*, 1999).

Atualmente são grandes os esforços de vários grupos de pesquisas em desenvolver uma vacina eficaz, capaz de proteger bovinos contra a infecção e mesmo contra o desenvolvimento de LP e/ou linfossarcoma. Entretanto, apesar de estarem sendo empregadas diferentes metodologias, tanto tradicionais quanto moleculares, até o momento não há disponibilidade comercial de uma vacina para o controle da LEB.

## Referências

- ABREU, J.M.G. *Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose bovina em animais criados na bacia leiteira de Fortaleza, Estado do Ceará*. 1993, 75p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- ABREU, V.L.V.; SILVA, J.A.; MODENA, C.M. Prevalência da leucose enzoótica bovina nos estados de Rondônia e Acre. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 42, n. 3, p. 203-210, 1990.
- AGRESTI, A. *et al.* Use of polymerase chain reaction to diagnose bovine leukemia virus infection in calves at birth. *Am. J. Vet. Res.*, v. 54, n. 3, p. 373-378, 1993.
- ALFONSO, R.; ALMANSA, J.E.; BARRERA, J.C. Serological prevalence and evaluation of the risk factors of bovine enzootic leukosis in the Bogota savannah and the Ubate and Chiquinquirá Valleys, *Rev. Sci. Tech.*, v. 17, n. 3, p. 723-732, 1998.
- ALTANER, C. *et al.* Envelope glicoprotein gp51 of bovine leukemia virus is differently glycosylated in cells of various species organ origin. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 36, p. 163-177, 1993.
- AMILLS, M. *et al.* The major histocompatibility complex of ruminants. *Rev. Sci. Tech.*, v. 17, n. 1, p. 108-120, 1998.
- ANDRADE, J.R.A.; ALMEIDA, M.M.R. Prevalência da leucose enzoótica bovina na bacia leiteira de Goiânia, Goiás. *Hora Veterinária*, v. 60, p. 49-53, 1991.
- BAUMGARTNER, L.; OLSON C.; ONUMA M. Effect of pasteurization and heat treatment on bovine leukemia virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 169, n. 11, p. 1189-1191, 1976.
- BIRGEL JR., E.H. *et al.* Prevalência da infecção pelo vírus da Leucose dos bovinos, em animais da raça Jersey, criados no estado de São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 15, n. 4, p. 93-99, 1995.
- BRILLOWSKA, A. *et al.* Protection of cattle against bovine leukemia virus (BLV) infection could be attained by DNA vaccination. *Acta. Biochim. Pol.*, v. 46, n. 4, p. 971-996, 1999.
- BRUCK, C. *et al.* Monoclonal antibodies define eight independent antigenic regions on the bovine leukemia virus (BLV) envelope glicoprotein gp51. *Virology*, v. 122, p. 342-352, 1982.
- BUEHRING, G.C.; KRAMME, P.M.; SCHULTZ, R.D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. *Lab. Investig.*, v. 71, n. 3, p. 359-365, 1994.
- BURNY, A. *et al.* Bovine leukemia: facts and hypothesis derived from the study of an infectious cancer. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, v. 32, p. 149-170, 1988.
- BURRIDGE, M.J.; PUHR, D.M.; HENNEMANN, J.M. Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida. *J. Am. Vet. Assoc.*, v. 179, n. 7, p. 704-707, 1981.
- CARVALHO, L. *et al.* Prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose dos bovinos em animais da raça holandesa preto e branca e zebuínos da raça nelore, criados no pólo regional de Londrina, estado do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 17, n. 1, p. 53-57, 1996.
- DIGIACOMO, R.F. Horizontal transmission of the bovine leukemia virus. *Vet. Med.*, n. 3, p. 263-270, 1992a.
- DIGIACOMO, R.F. The epidemiology and control of bovine leukemia virus infection. *Vet. Med.*, n. 3, p. 248-257, 1992b.
- DIGIACOMO, R.F. Vertical transmission of the bovine leukemia virus. *Vet. Med.*, n. 3, p. 258-263, 1992c.
- DIMMOCK, C.K.; CHUNG Y.S.; MACKENZIE, A.R. Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. *Aust. Vet. J.*, v. 68, n. 7, p. 230-233, 1991.
- DIVERS, T.J. *et al.* Evidence for transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation in a commercial dairy herd. *Prev. Vet. Med.*, v. 23, n. 3-4, p. 133-141, 1995.
- DOLZ, G.; MORENO, E. Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting for the detection of BLV antibodies. *Zentralbl. Vetmed. BEIH.*, v. 46, n. 8, p. 551-558, 1999.
- DOMENECH, A. *et al.* *In vitro* infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus. *J. Gen. Virol.*, n. 1, p. 109-118, 2000.
- DUSINSKY, R.; BARDOTTI, M.; PONTI, W. Decreased expression of L-selectin (CD62L) on lymphocytes in enzootic bovine leukaemia. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.*, v. 47, n. 2, p. 127-132, 2000.
- EVERMANN, J.F. A look at how bovine leukemia virus infection is diagnosed. Symposium on bovine leukemia virus infection. *Vet. Med.*, n. 3, p. 272-278, 1992.
- FECHNER, H. *et al.* Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *Zentralbl. Vetmed. BEIH.*, v. 43, n. 10, p. 621-630, 1996.
- FELDMAN, W.H. Lymphosarcoma in the bovine abomasum. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v. 73, p. 206-215, 1928.
- FERRER J.F. Bovine leukosis: Natural transmission and principles of control. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 175, n. 12, p. 1281-1286, 1979.
- FERRER, J.F.; DIGILO C.A. Development of *in vitro* infectivity assay for C-type bovine leukemia virus. *Cancer Res.*, v. 36, p. 1068, 1976.
- FLORES, E.F.; WEIBLEN, R.; REBELATO, M.C. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB) na região central do Rio Grande do Sul. *Hora Veterinária*, v. 10, n. 58, p. 35-29, 1990.
- FLORES, E.F. *et al.* Anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) em soros bovinos provenientes da República Oriental do Uruguai. *Hora Veterinária*, v.12, n.68, p.5-8, 1992.

- GHEZZI, P.C.; DOLCINI, G.L.; GUTIERREZ, S.E. Bovine leukemia virus (BLV): prevalence in the Cuenca Lechera Mar y Sierras from 1994 to 1995. *Rev. Argent. Microbiol.*, v. 29, n. 3, p. 137-146, 1997.
- GILDEN, R.V. *et al.* Characteristics of the major internal protein and RNA-dependent DNA polymerase of bovine leukemia virus. *J. Gen. Virol.*, v. 29, p. 305, 1975.
- GRAVES, D.C.; FERRER, J.F. *In vitro* transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Cancer Res.*, v. 36, p. 4152, 1976.
- HASSELSCHWERT, D.L. *et al.* Relative susceptibility of beef and dairy calves to infection by bovine leukemia virus via tabanid (Diptera: Tabanidae) feeding. *J. Med. Entomol.* v. 30, n. 2, p. 472-473, 1993.
- HEALD, M.T.S. *et al.* The prevalence of anti-bovine leukemia virus antibodies in dairy cows and associations with farm management practices, production and culling in Ontario. *Prev. Vet. Med.*, v. 14, n. 1-2, p. 45-55, 1992.
- HEENEY, J.L. *et al.* Evidence for bovine leukemia virus infection of peripheral blood monocytes and limited antigen expression in bovine lymphoid tissue. *Lab. Investig.*, v. 66, n. 5, p. 608-617, 1992.
- JACOBSEN, K.L. Transmission of bovine leukemia virus: Prevalence of antibodies in precolostral calves. *Prev. Med. Vet.*, n. 1, p. 265-272, 1983.
- JOHNSON, R.; KANEENE, J.B. Bovine leukemia virus. Part I. Descriptive epidemiology, clinical manifestations, and diagnostic tests. *The Compendium Food Animal.*, v. 13, n. 2, p. 315-324, 1991a.
- JOHNSON, R.; KANEENE, J.B. Bovine leukemia virus. Part II. Risk factors of transmission. *The Compendium Food Animal*, v. 13, n. 4, p. 681-691, 1991b.
- JOHNSON, R.; KANEENE, J.B. Bovine leukemia virus. Part IV. Economic impact and control measures. *The Compendium Food Animal*, v. 13, n. 11, p. 1727-1737, 1991c.
- JOHNSON, R.; KANEENE J.B. Bovine Leukaemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. *Veterinary Bulletin*, v. 62, n. 4, p. 287-312, 1992.
- KANEENE J.B.; NICOL, J.; GIBSON, C.D. Bovine leukemia virus: question and answers for farmers. *Michigan State University Agricultural Experiment Station*, E1674, 1983.
- KANTEK, C.E.; KRUGER, E.R.; WELTE, V.R. Prevalência do vírus da leucose enzoótica bovina no rebanho leiteiro do Paraná. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 3, n. 4, p. 125-129, 1983.
- KERKHOF, P. *et al.* *In vitro* and *in vivo* oncogenic potential of bovine leukemia virus G4 protein. *J. Virol.*, v. 72, n. 3, p. 2554-2559, 1998.
- KETTMANN, R. *et al.* Genomic integration of bovine leukemia provirus: comparison of persistent lymphocytosis with lymph node tumor form of enzootic bovine leukosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 77, n. 5, p. 2577-2581, 1980.
- KETTMANN, R. *et al.* Genomic integration of bovine leukemia provirus and lack of viral RNA expression in the target cells of cattle with different responses to BLV infection. *Hamatol. Bluttransfus.*, v. 26, p. 495-497, 1981.
- LASSAUZET, M.L. *et al.* Factors associated with in utero or periparturient transmission of bovine leukemia virus in calves on a California dairy. *Can. J. Vet. Res.*, v. 55, n. 3, p. 264-268, 1991.
- LEISERING, A. Hypertrophy der Malpighischen Körperchen der milz. *Berl. Vet. Wes. Kgr.*, v.16, p.15-16, 1871.
- MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Serological detection of bovine leukemia virus infection. *Vet. Microbiol.*, v. 1, p. 195, 1976.
- MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Eur. J. Cancer*, v. 13, p. 1369, 1977.
- MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Bovine Leukosis – Its importance to the dairy industry in the United States. *J. Dairy Sci.*, v. 65, p. 2194-2203, 1982.
- MIRSKY, M. *et al.* The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. *J. Virol.*, v. 70, p. 2178, 1996.
- MORAES, M.P. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina nos rebanhos leiteiros do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 26, n. 2, p. 257-262, 1996.
- MURPHY, F.A. *et al.* *Veterinary Virology*, 3ª ed. San Diego: Academic Press, 1999. 629 p.
- PORTETELLE, D. *et al.* Detection of complement-dependent lytic antibodies in sera from bovine leukemia virus-infected animals. *Ann. Rech. Vet.*, v.9, p.667-674, 1978.
- RANGEL, N.M.; MACHADO, A.V. Contribuição à oncologia comparada em Minas Gerais. *Arq. Esc. Sup. Vet. Minas Gerais*, v. 1, p. 84-96, 1943.
- ROMERO, C.H.; ROWE, C.A. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. *Trop. Anim. Health. Prod.*, v. 13, p. 107-111, 1981.
- SANTOS, J.L.; FARIA, J.E.; RIBEIRO, M.F.B. Epidemiologia da leucose enzoótica bovina no estado de Minas Gerais. I-Prevalência de anticorpos na zona da mata. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* v. 37, n. 4, p. 359-368, 1985.
- SARGEANT, J.M. *et al.* 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.
- SCHOTTLER, F.; SCHOTTLER, H. Über ätiologie und therapie der aleukämischen lymphadenose des rindes. *Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr.*, v. 50, p. 497-502, 513-517, 1934.
- SCHWARTZ-CORNIL I. *et al.* Bovine leukaemia virus-induced lymphocytosis in sheep is associated with reduction of spontaneous B cell apoptosis. *J. Gen. Virol.*, v. 78, (Pt 1), p. 153-162, 1997.
- SHIRLEY, J.E. *et al.* Dairy production management update: Bovine Leucosis. *The Compendium Food Animal*, n. 5, p. 651-654, 1997.
- SORENSEN, D.K. Bovine lymphocytic leukemia. Epidemiologic studies. *WHO Conference on Comparative Study Leukemias*. Philadelphia (USA), rep. 26, 1961.
- STRAUB, O.C. Horizontal transmission studies on enzootic bovine leukosis. *Ann. Rech. Vet.*, v. 9, n. 4, p. 809-813, 1978.
- STONE, D.M.; NORTON, L.K.; DAVIS, W.C. Spontaneously proliferating lymphocytes from bovine leukaemia virus-infected, lymphocytotic cattle are not the virus-expressing lymphocytes, as these cells are delayed in G0/G1 of the cell cycle and are spared from apoptosis. *J. Gen. Virol.*, v. 81, p. 971-981, 2000.

- SUGIMOTO, M.; OHISHI, K.; IKAWA, Y. Role of cell-mediated immunity in bovine leukemia virus (BLV) infection in ruminants: its implication for the vaccination strategy against retroviruses. *Ther. Immunol.*, v. 1, n. 5, p. 297-301, 1994.
- TÁVORA, J.P.F. *Prevalência da infecção pelo vírus da leucose bovina em rebanhos leiteiros criados na região do pólo Itabuna, estado da Bahia*. 1990, 106p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- TEKES, L. Influence of management technology and parturition on antibody levels in cows with bovine leukosis. *Acta. Vet. Hung.*, v. 42, n. 1, p. 57-67, 1994.
- TRAININ, Z. *et al.* 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.
- TWIZERE, J.C. *et al.* Discordance between bovine leukemia virus tax immortalization *In vitro* and oncogenicity *In vivo*. *J. Virol.*, v. 74, n. 21, p. 9895-9902, 2000.
- VAN DER MAATEN, M.J. Factors affecting the transmission of bovine leukemia virus from cows to their offspring. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.* v. 15, p. 225-243, 1982.
- VAN DER MAATEN, M.J.; MILLER, J.M.; BOOTHE A.D. Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissue from cattle with lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 52, p. 491, 1974.
- WILESMITH, J.W. Some observations of the epidemiology of bovine leukosis virus infection a large dairy herd. *Res. Vet. Sci.* v.28, p.10-16, 1980
- WHITTIER, D. Programs can rid herds of bovine leukosis. *Hoard's Dairyman.*, v. 138, n. 8, p. 405, 1990.
- YAKOBSON, B. *et al.* 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.
- YAMAMOTO H. *et al.* Histopathological definition of the adult and calf types of bovine leukosis. *Natl. Inst. Anim. Health. Q (Tokyo).*, v. 22, n. 3, p. 115-129, 1982.
- ZANOTTI, M. *et al.* 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.

