

## Proliferação de linfócitos e apoptose de células CD5<sup>+</sup> de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina

[Apoptosis of CD5<sup>+</sup> cells and lymphocyte proliferation in bovine leukemia virus-infected dairy cows]

F.N. Souza<sup>1</sup>, A.O. Latorre<sup>2</sup>, B.D. Caniceiro<sup>2</sup>, M. Sakai<sup>2</sup>, K. Kieling<sup>2</sup>,  
M.G. Blagitz<sup>1</sup>, A.M.M.P. Della Libera<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunodiagnóstico - Departamento de Clínica Médica  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo  
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87  
05508-270 - São Paulo, SP

<sup>2</sup>Laboratório de Farmacologia e Toxicologia - Departamento de Patologia  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo - São Paulo, SP

### RESUMO

Avaliaram-se a proliferação de linfócitos e a apoptose de células CD5<sup>+</sup> de bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina. Para tal, 100 vacas da raça Holandesa, em lactação, foram triadas quanto ao sorodiagnóstico para a leucose enzoótica bovina e o perfil hematológico, e 15 foram escolhidos e distribuídos uniformemente entre os três grupos, a saber: animais negativos, animais positivos alinfocitóticos e animais positivos e que manifestaram linfocitose persistente (LP). Para a avaliação da proliferação de linfócitos, procedeu-se ao isolamento das células mononucleares por gradiente de centrifugação, em que 2x10<sup>6</sup> linfócitos por mL foram plaqueados por poço e analisados por citometria de fluxo utilizando-se o fluorocromo CFSE-DA. A apoptose do sangue periférico deu-se utilizando a anexina V-FITC, e para a identificação das células CD5<sup>+</sup>, utilizaram-se anticorpos monoclonais. Ocorreu menor proliferação de linfócitos nos animais infectados e que manifestavam LP, e menor apoptose de células CD5<sup>+</sup> do sangue periférico. Pode-se sugerir que o desenvolvimento da LP, resultante do aumento de linfócitos B, deve-se à redução do processo apoptótico das células CD5<sup>+</sup>, principal população infectada, e que a maior proliferação linfocitária pode se restringir apenas ao estágio inicial do desenvolvimento da LP.

Palavras-chave: leucose enzoótica bovina, proliferação de linfócito, apoptose

### ABSTRACT

*The purpose of the present trail was to evaluate the lymphocyte proliferation and the apoptosis rates of CD5<sup>+</sup> cells in dairy cows infected with bovine leukemia virus (BLV) with distinct lymphocyte profiles in infected animals known as alymphocytotic (AL) and persistent lymphocytosis (PL). A total of 100 Holstein cows were sera tested for bovine leukemia virus through agar gel immunodiffusion (AGID) and enzyme-linked immunosorbent-assay (ELISA). From these animals, 15 cows were selected and divided uniformly in 3 groups (negative, AL, LP). The lymphocyte proliferation was performed using flow cytometric measurement of CFSE-DA dye, where 2x10<sup>6</sup>/mL lymphocytes were plated per well. The apoptosis of CD5<sup>+</sup> cells from peripheral blood was performed using the annexin V-FITC to measure the apoptosis rates and the identification of CD5<sup>+</sup> was accessed using monoclonal antibodies. Animals from the LP group showed lower lymphocyte proliferation and also lower apoptosis rates of CD5<sup>+</sup> cells compared with negative and AL animals. The development of PL which resulted from an increase in B cell count, is due to the decrease in the apoptosis rates of CD5<sup>+</sup> cells, and the higher lymphocyte proliferation appears to be limited only in the initial stages of development of LP.*

Keywords: bovine leukemia virus, lymphocyte proliferation, apoptosis

---

Recebido em 19 de abril de 2010

Aceito em 13 de abril de 2011

E-mail: nogueirasouza@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

O vírus da leucose enzoótica bovina (VLEB) é um dos mais prevalentes patógenos em vários países, principalmente em rebanhos leiteiros. É um deltaretrovírus oncogênico associado ao desenvolvimento da linfocitose persistente (LP) e dos linfossarcomas em bovinos. A LP é caracterizada por elevação crônica do número de linfócitos circulantes, no caso linfócitos B, sendo encontrada em aproximadamente 20 a 30% dos animais infectados (Gillet *et al.*, 2007). Tumores nos órgãos linfoides são encontrados em cerca de 0,1 a 10% dos animais infectados, enquanto a maioria dos animais infectados permanecem assintomáticos ou alinfocitóticos (AL) (Gillet *et al.*, 2007).

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

O presente estudo buscou avaliar a proliferação de linfócitos e a apoptose de células CD5<sup>+</sup> em vacas da raça Holandesa, em lactação, infectadas pelo VLEB e que manifestavam ou não LP.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sangue de 100 fêmeas bovinas adultas da raça Holandesa, oriundas de rebanhos destinados à produção de leite, localizados no estado de São Paulo. Dentre estes, 15 foram escolhidos e distribuídos uniformemente em três grupos, conforme o resultado do sorodiagnóstico e do leucograma, em: animais com sorodiagnóstico negativo (grupo-negativo), animais com sorodiagnóstico positivo alinfocitóticos (grupo AL) – em que foram escolhidos animais sem alterações hematológicas conforme critérios estabelecidos

para a espécie (Divers e Pike, 2008) e sem alterações clínicas evidentes – e animais com sorodiagnóstico positivo e que apresentavam LP (grupo LP). A persistência da linfocitose deu-se após período de 72 dias, sendo considerados animais com LP aqueles com contagem total de linfócitos acima de  $10 \times 10^3/\mu\text{L}$  e contagem total de leucócitos acima de  $15 \times 10^3/\mu\text{L}$ , conforme critérios estabelecidos por Brenner *et al.* (2007).

A análise hematológica foi realizada por meio da mensuração pelo aparelho ABX<sup>®</sup> (Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, França), em que se obteve a contagem total de leucócitos por microlitro, que foi complementada pela contagem diferencial em esfregaços sanguíneos.

O sorodiagnóstico da leucose enzoótica bovina (LEB) foi realizado por *kit* comercial de IDGA (Tecpar<sup>®</sup>, Curitiba, Brasil), e por *kit* comercial de ELISA (VRMD, Pullman, EUA, n.º. cat. 284-5), mediante a detecção da glicoproteína gp51 do VLEB, conforme recomendações do fabricante.

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas por gradiente de densidade Ficoll-Paque<sup>TM</sup> Plus<sup>®</sup> (GEHealthcare, EUA, n.º. cat. 17-1440-03) (densidade  $1,077\text{g}/\text{cm}^3$ ) em fluxo laminar. Resumidamente, 10mL de sangue periférico foram adicionados a 10mL de meio de cultura celular RPMI-1640<sup>®</sup> (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n.º. cat. R7638) contendo 2mM de L-glutamina (GIBCO<sup>TM</sup> Invitrogen, Grand Island, EUA, n.º. cat. 21051-024) e  $5 \times 10^{-2}\text{mM}$  de 2-mercaptoetanol (Invitrogen, Grand Island, EUA, n.º. cat. 21985-023). A solução celular resultante foi, então, cuidadosamente colocada sobre a fase de Ficoll e submetida à centrifugação (700g) por 40 minutos a 18°C. Após a centrifugação, a camada de células mononucleares, localizada na interface entre a camada de Ficoll e constituintes do plasma, foi coletada e transferida para tubo cônico de 15mL, que foi completado com RPMI-1640<sup>®</sup>, e submetido à centrifugação (250g) por oito minutos. Posteriormente, procedeu-se à lise das hemácias utilizando-se 10mL de solução de cloreto de amônio (0,8% de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,1mM EDTA). Realizada nova centrifugação (250g por 8 minutos), o botão celular resultante foi ressuspendido em 4mL de RPMI-1640<sup>®</sup>.

A avaliação da proliferação celular deu-se pela utilização do CFSE-DA (5-(6-)

*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) – 5mM/mL – (Invitrogen, Carlsbad, EUA, n.º. cat. C1157), como descrito por Lyons e Parish (1994), Lyons (2000) e Hawkins *et al.* (2007). Os ensaios de proliferação linfocitária também foram induzidos por concavalina-A tipo III (10µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n.º. cat. C2631) e por lipopolissacárides (LPS) de *Escherichia coli* (cepa O127:B8) (25µg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA, n.º. cat. L3129).

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

Mediante a obtenção e o ajuste do número de linfócitos, adicionou-se às amostras 1µL do fluorocromo CFSE-DA, que foi incubado por 20 minutos em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, centrifugaram-se e ressuspenderam-se as amostras em RPMI-1640<sup>®</sup> estéril contendo 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil), 2mM de L-glutamina,  $5 \times 10^{-2}$ mM de 2-mercapoetanol. Realizou-se o reajuste celular para  $2,2 \times 10^6$  células/mL, com o objetivo de ter  $2 \times 10^5$  células por poço de cultura (90µL). Ajustadas, as suspensões celulares foram plaqueadas em triplicata, juntamente com seus respectivos estímulos (10µL), e mantidas em cultura celular em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por três dias, para posterior avaliação por citometria de fluxo, onde 50.000 eventos foram adquiridos.

O cálculo da proliferação deu-se pela análise da população correspondente aos linfócitos, no *software FlowJo*, que calcula a progressão geométrica de decaimento do fluorocromo CFSE das células. Considerou-se que cada célula plaqueada continha 100% do CFSE fornecido, ao realizar mitose, e 50% restaria de fluorocromo em cada célula-filha. Estas, à divisão, fornecem 25% a cada célula-filha, cujas filhas, por sua vez, passariam a ter 12,5% do fluorocromo, e assim sucessivamente (Lyons e Parish, 1994; Lyons, 2000).

A expressão da fosfatilserina (FS) na superfície celular é um dos marcadores precoces do processo apoptótico. A identificação da porcentagem de células CD5<sup>+</sup> sofrendo apoptose foi realizada utilizando-se a anexina V-FITC (APOPTTEST<sup>™</sup>-FITC, Dako Cytomation, Finlândia, cat. Number K2350) e analisada por citometria de fluxo, como descrito por Vermes *et al.* (1995), com algumas modificações.

Para tal, 100µL de sangue venoso heparinizado foram utilizados. Inicialmente, os eritrócitos, lisados e submetidos à centrifugação, foram ressuspensos em 1,000µL de tampão de ligação (10mM Hepes/ 150mM NaCl/1mM MgCl<sub>2</sub>, 1,8mM CaCl<sub>2</sub>). Posteriormente, submeteram-se as amostras à nova centrifugação e ressuspensão em 100µL de tampão de ligação com anexina V-FITC, e, finalmente, incubou-se a suspensão celular por 20 minutos à temperatura ambiente, sob ausência de luminosidade.

A quantificação da população de linfócitos CD5<sup>+</sup> do sangue total foi realizada utilizando-se anticorpo monoclonal primário: *mouse IgG2a anti-bovine CD5* (VRMD, Pullman, EUA, n.º. cat. B29A), e anticorpo monoclonal secundário *goat anti-mouse IgG2a* conjugado ao fluorocromo ficoeritrina (PE) (Invitrogen, Carlsbad, EUA, n.º. cat. M32204). Para tal, as amostras, após a realização do ensaio para determinação do processo apoptótico, foram centrifugadas a 250g por oito minutos. O botão celular resultante foi ressuspensionado em 100µL de tampão de ligação e, então, incubado com 1µL do anticorpo primário por 30 minutos à temperatura ambiente, sob ausência de luminosidade. Mais uma vez, foi adicionado a cada tubo 1 mL de tampão de ligação e submetido à centrifugação (250g) por oito minutos. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em 100µL de tampão de ligação e incubadas com 1µL do anticorpo secundário por 30 minutos à temperatura ambiente, sob ausência de luminosidade. Logo após, adicionou-se 1mL de tampão de ligação e submeteu-se à centrifugação. As amostras foram ressuspensas em 300µL de tampão de ligação e, então, analisadas por citometria de fluxo FACSCalibur<sup>™</sup> (Becton Dickinson Immunocytometry System<sup>™</sup>, San Diego, EUA), em que 20.000 eventos referentes à população de linfócitos CD5<sup>+</sup> foram adquiridos.

A distribuição de Gaussian foi confirmada pelo teste de Kolmogorov e Smirnov. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância para se verificar as diferenças entre os grupos. Caso houvesse diferença significativa, procedeu-se ao teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas entre as médias. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prisma 5.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Foram consideradas significantes as análises que apresentaram  $P \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

Os resultados da sorologia demonstraram 25,0% de animais reagentes ao sorodiagnóstico por IDGA e 87,0% ao sorodiagnóstico por ELISA. Os dados hematológicos dos 15 animais utilizados segundo os grupos são apresentados na Tab. 1.

A proliferação basal de linfócitos dos 15 animais utilizados no presente estudo sob os diferentes mitógenos e/ou estímulos divididos nos seus respectivos grupos está apresentada na Tab. 2.

Tabela 1. Contagem total de leucócitos, de neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos de 15 bovinos infectados ou não pelo vírus da leucose enzoótica bovina de acordo com os grupos

Grupo	Leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	Neutrófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	Linfócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	Eosinófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ )	Monócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ )
LP	19,7 (17,5–35,7)a	4368 (3088–5712)a	14381 (11700–29274)a	788 (357–1400)a	273 (175–714)a
CV (%)	31,75	21,42	39,04	50,59	62,86
AL	10,8 (9,6–12,0)b	2940 (2304–4095)a	6496 (5782–7236)b	756 (696–960)a	294 (108–464)a
CV (%)	9,16	24,69	8,39	14,10	46,43
Neg	10,8 (9,6–11,7)b	2208 (1690–4680)a	6600 (5700–8532)b	960 (108–1482)a	228 (96–605)a
CV (%)	9,21	46,21	17,89	63,04	84,00

Letras distintas na coluna indicam diferenças entre grupos pelo teste Tukey-Kramer ( $P \leq 0,05$ )

LP: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina manifestando linfocitose persistente; AL: animais sororreagentes ao antígeno gp51 do vírus da leucose enzoótica bovina alinfocitóticos; Neg: animais não sororreagentes ao antígeno gp51.

Tabela 2. Índice de proliferação celular e porcentagem de linfócitos responsivos segundo os grupos

Grupo	Índice de proliferação		
	Basal	Con-A	LPS
BLV <sup>-</sup>	0,153±0,029a	0,300±0,141a	0,137±0,023ab
BLV <sup>+</sup> /PL <sup>-</sup>	0,143±0,014a	0,26±0,006a	0,160±0,018a
BLV <sup>+</sup> /PL <sup>+</sup>	0,083±0,014b	0,193±0,081a	0,110±0,009b
P	0,001	0,29	0,01
	Linfócitos responsivos (%)		
BLV <sup>-</sup>	14,63±2,55a	25,62±9,35a	12,65±2,06ab
BLV <sup>+</sup> /PL <sup>-</sup>	13,69±1,09a	24,12±0,53a	15,19±1,46a
BLV <sup>+</sup> /PL <sup>+</sup>	7,93±1,55b	17,16±7,69a	9,78±1,09b
P	0,001	0,116	0,01

Letras distintas na coluna indicam diferenças entre grupos pelo teste Tukey-Kramer ( $P < 0,05$ ).

Basal: sem estímulo

Con-A: concavalina-A type III (10µg/mL)

LPS: lipopolissáccido de *Escherichia coli* O127:B8 (25µg/mL)

BLV<sup>-</sup>: animais negativos pela imunodifusão em ágar gel (IDGA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) sem alteração hematológica

BLV<sup>+</sup>/PL<sup>-</sup>: animais positivos pela IDGA e ELISA sem alteração hematológica

BLV<sup>+</sup>/PL<sup>+</sup>: animais negativos pela IDGA e ELISA com linfocitose persistente (LP).

P: valor de significância

A porcentagem de linfócitos CD5<sup>+</sup> do sangue periférico sofrendo apoptose (CD5<sup>+</sup>/annexin V-FITC<sup>+</sup>) foi de 0,56±0,34%<sup>a</sup>; 0,60±0,35%<sup>a</sup>; e 0,11±0,08%<sup>b</sup> (P = 0,031) nos grupos negativo, AL e LP, respectivamente. Como esperado, a viabilidade de células CD5<sup>+</sup> (CD5<sup>+</sup>/annexin V-FITC<sup>-</sup>) foi significativamente maior no grupo LP (99,9±0,08%) (P = 0,031) se comparado aos grupos negativos (99,44±0,34%) e AL (99,4±0,35%).

## DISCUSSÃO

Verificou-se menor proliferação de linfócitos nos animais do grupo LP associada à redução da apoptose de células CD5<sup>+</sup>. De fato Debacq *et al.* (2003), Florins *et al.* (2007) e Florins *et al.* (2008) relataram menor expansão clonal de linfócitos associado à redução da morte celular nos animais infectados pelo VLEB que manifestaram LP. Debacq *et al.* (2002), ao avaliarem a proliferação de linfócitos em ovelhas, encontraram maior proliferação de linfócitos nos animais infectados pelo VLEB. Tal fato enfatiza a importância da condição e do modelo experimental envolvidos. Amills *et al.* (2002) também verificaram redução da expressão de interleucina- 2 (IL-2), que é a principal citocina envolvida com a proliferação linfocitária nestes animais.

Foi proposto, entretanto, que a proliferação de linfócitos pudesse ocorrer em outros sítios – linfonodos, placas de Peyer ou medula óssea, e subsequentemente, Debacq *et al.* (2006) confirmaram este fato em ovelhas. Apesar de as ovelhas se apresentarem como modelo para o estudo da manifestação da LP na infecção pelo VLEB, esta espécie não é hospedeira natural do vírus, visto que a transmissão não ocorre entre ovinos e bovinos. Adicionalmente a isto, a patogênese da infecção pelo VLEB apresenta-se mais aguda em ovinos, resultado do menor período de latência anterior ao desenvolvimento da LP. Além disso, quase todos os ovinos infectados sucumbem em decorrência da infecção pelo VLEB, o que ocorre em apenas cerca de 5% dos bovinos. Uma das principais diferenças refere-se à carga viral, em que a maioria dos bovinos que permanece clinicamente saudável apresenta apenas 1% ou menos dos leucócitos infectados e a carga viral permanece relativamente constante por longo período. Em ovinos, o número de células infectadas aumenta

gradualmente até o início da leucemia; desse modo, essas observações ilustram a diferença da indução da patogênese pelo VLEB nessas espécies (Florins *et al.*, 2007).

Debacq *et al.* (2004) também demonstraram que o pico da proliferação de linfócitos ocorre logo anterior à soroconversão e à alta carga viral em ovinos. Dessa forma, pode-se sugerir que a maior proliferação linfocitária em bovinos infectados pelo VLEB pode restringir-se apenas aos estágios iniciais da infecção, e que a LP persiste pela modulação do processo apoptótico pelo vírus, como descrito por Schwartz-Cornil *et al.* (1997), Cantor *et al.* (2001), Florins *et al.* (2007) e Gillet *et al.* (2007).

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

Sabe-se que a persistência da infecção ocorre possivelmente associada à diferença da expressão de antígenos virais nas células infectadas, o que resulta na eliminação das células que os expressam (Florins *et al.*, 2007; Gillet *et al.*, 2007). Este fato é de extrema importância, visto que, logo após a infecção, a atividade da resposta humoral e citotóxica é capaz de abolir a replicação viral, permitindo apenas a expansão clonal das células portadoras do provírus, o que poderia justificar a maior proliferação de linfócitos em se restringir apenas aos estágios iniciais da infecção.

A supressão viral *in vitro* por anticorpos anti-VLEB e por inibidores da proteína quinase C reduz a proliferação celular (Stone *et al.*, 2000). A expressão de proteínas virais é detectada em 5 a 15% das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de animais com LP, sendo a maioria dessas células correlacionadas com a inibição do processo apoptótico, corroborados pelo fato de a expansão clonal ocorrer em apenas 3% dos linfócitos que expressam o vírus (Stone *et al.*, 2000).

## CONCLUSÕES

O desenvolvimento da LP deve-se à redução do processo apoptótico pelas células CD5<sup>+</sup>, principal população infectada pelo VLEB, e a maior proliferação linfocitária pode restringir-se apenas ao estágio inicial do desenvolvimento da LP.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido (projeto 07/56069-8).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AMILLS, M.; NORIMINE, J.; OLMSTEAD, C.A.; LEWIN, H.A. Cytokine mRNA expression in B cells from bovine leukemia virus-infected cattle with persistent lymphocytosis. *Cytokine*, v.28, p.25-28, 2004.
- BRENNER, J.; AVIDAR, J.; LAHAV, D. Bovine leukemia virus infection should also be considered in the differential diagnosis of nonspecific clinical manifestations. *Israel J. Vet. Med.*, v.62, p.30-31, 2007.
- CANTOR, G.L.; PRITCHARD, S.M.; DEQUIET, F. *et al.* CD5 is associated from the B-cell receptor in B cells from bovine leukemia virus-infected, persistently lymphocytotic cattle: consequences to B-cell receptor-mediated-apoptosis. *J. Virol.* v.75, p.1689-1696, 2001.
- DEBACQ, C.; ASQUITH, B.; KERKHOFS, P.; PORTETELLE, D. *et al.* Increased Cell Proliferation, but not Reduced Cell Death, Induces Lymphocytosis in Bovine Leukemia Virus-infected Sheep. *Proc. of the Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v.99, p.10048-10053, 2002.
- DEBACQ, C.; ASQUITH, B.; REICHERT, M. *et al.* Reduced cell turnover in bovine leukemia virus-infected, persistently lymphocytotic cattle. *J. Virol.*, v.77, p.13073-13083, 2003.
- DEBACQ, C.; SANCHEZ-ALCARAZ, M.T.; MORTREUX, F. *et al.* Reduced proviral loads during primo-infection of sheep by bovine leukemia virus attenuated mutants. *Retrovirology*, 1:31, p.1-13, 2004.
- DEBACQ, C.; GILLET, N.; ASQUITH, B. *et al.* 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, p.9710-9719, 2006.
- DIVERS, T.J.; PEEK, S.F. *Rebhun's Disease of Dairy Cattle*. St. Louis: Saunders Elsevier, 2008, 704p.
- FLORINS, A.; GILLET, N.; ASQUITH, B. *et al.* Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. *Frontiers in Bioscience*, v.12, p.1520-1531, 2007.
- FLORINS, A.; BOXUS, M.; VANDERMEERS, F. *et al.* Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus; a rationale for host susceptibility to disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.125, p.01-07, 2008.
- GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUS, M. *et al.* Mechanism of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus prospects for a novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*, 4:18, 2007.
- HAWKINS, E.D.; HOMMEL, M.; TURNER, M.L. *et al.* Measuring lymphocyte proliferation, survival and differentiation using CFSE time-series data. *Nat. Protoc.*, v. 2, p. 2057-2067, 2007.
- LYONS, A.B.; PARISH, C.R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, v.171, p.131-137, 1994.
- LYONS, A.B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Methods*, v.243, p.147-154, 2000.
- SCHWARTZ-CORNIL, I.; CHEVALLIER, N.; BELLOC, C. *et al.* Bovine leukaemia virus-induced lymphocytosis in sheep is associated with reduction of spontaneous B cell apoptosis. *J. Gen. Virol.*, v.78, p.153-162, 1997.
- 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 G<sub>0</sub>G<sub>1</sub> of the cell cycle and are spared from apoptosis. *J. Gen. Virol.*, v.81, p.971-981, 2000.

TAKAHASHI, M.; TAJIMA, S.; TAKESHIMA, S. *et al.* Ex vivo of peripheral blood mononuclear cells in sheep induced by bovine leukemia virus (BLV) mainly occurs in CD5 B cells that express BLV. *Microbes and Infection*, p.584-595, 2004.

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