

## DINÂMICA DAS PROTEÍNAS SÉRICAS DE FÊMEAS BOVINAS DA RAÇA HOLANDESA NATURALMENTE INFECTADAS PELO VÍRUS DA LEUCOSE DOS BOVINOS

### SERUM PROTEIN DYNAMICS IN HOLSTEIN COWS NATURALLY INFECTED WITH BOVINE LEUKEMIA VIRUS

Eduardo Harry Birgel Junior<sup>1</sup> Lucila Cardoso de Almeida Salvatore<sup>2</sup> Flávia Signorini Neves<sup>2</sup>  
Regina Mieke Sakata Mirandola<sup>3</sup> Patrício Marques de Souza<sup>4</sup> Eduardo Harry Birgel<sup>5</sup>

#### RESUMO

Com o objetivo de avaliar a dinâmica das proteínas séricas de fêmeas bovinas da raça holandesa, criadas no Estado de São Paulo e naturalmente infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos, foram colhidas 60 amostras de soro sanguíneo. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: Grupo 1 - composto de 20 fêmeas não reagentes ao antígeno gp-51 do vírus da leucose dos bovinos; Grupo 2 - composto de 20 fêmeas reagentes ao antígeno gp-51 do vírus da leucose dos bovinos sem linfocitose; Grupo 3 - composto de 20 fêmeas reagentes ao antígeno gp-51 do vírus da leucose dos bovinos com linfocitose. A avaliação do proteinograma sérico foi realizada pela determinação dos teores séricos de proteína total pelo método do biureto e a separação das frações albumina, alfa globulina, beta globulina e gama globulina através de eletroforese. A determinação quantitativa dos níveis séricos de imunoglobulinas IgM e IgG foi realizada através de imunodifusão radial simples. Os valores séricos do proteinograma e da concentração sérica das imunoglobulinas IgG e IgM dos animais não reagentes ao vírus da leucose dos bovinos foram semelhantes àqueles observados nos animais reagentes ao vírus da leucose dos bovinos sem linfocitose e no grupo de animais reagentes ao vírus da leucose dos bovinos com linfocitose.

**Palavras-chave:** proteinograma, IgG, IgM, leucose enzoótica dos bovinos, proteínas séricas.

#### SUMMARY

In an attempt to determine the serum protein dynamics in cattle naturally infected with bovine leukemia virus, samples of blood sera from 60 cows of Holstein breed, raised in the State of São Paulo, Brazil, were collected. The animals were

divided in three Groups: Group 1- was composed of 20 bovine leukemia virus antibody negative cows; Group 2 - was composed of 20 cows reacting to the antigen (gp-51) of the bovine leukemia virus without lymphocytosis and Group 3 - was composed of 20 cows reacting to the antigen (gp-51) of the bovine leukemia virus with lymphocytosis. Serum total protein was determined by the biuret reaction and serum protein fractions (alpha, beta and gammaglobulin) by electrophoresis. Immunoglobulins IgM and IgG were determined by single radial immunodiffusion. There were no significant differences in the serum protein profiles and the concentration of serum IgG and IgM between the three groups (bovine leukemia virus antibody negative cows; bovine leukemia virus antibody positive cows without lymphocytosis and bovine leukemia virus antibody positive cows with lymphocytosis).

**Key words:** proteinogram, IgG, IgM, bovine leukosis, serum proteins.

#### INTRODUÇÃO

A leucose enzoótica dos bovinos é uma doença infecto-contagiosa determinada por um retrovírus, denominado vírus da leucose dos bovinos. Essa doença é caracterizada pelo aparecimento de uma sintomatologia pleomórfica em decorrência do desenvolvimento de tumorações com infiltração mononuclear em órgãos ricos em tecido linfóide como linfonodos, abomaso, coração, útero, baço, rins e alterações hematológicas, evidenciadas por leucocitose por linfocitose com aumento das formas linfocitárias atípicas (BIRGEL, 1982b).

<sup>1</sup>Médico Veterinário, Doutor, Professor Assistente, Centro de Pesquisa e Diagnóstico de Enfermidades de Ruminantes (CPDER), Departamento de Clínica Médica (DCM), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, 05508-900, Cidade Universitária, São Paulo, SP. E-mail: ehbirgel@usp.br. Autor para correspondência.

<sup>2</sup>Bolsista de Iniciação Científica da FAPESP.

<sup>3</sup>Farmacêutico, Mestre, DCM, FMVZ, USP.

<sup>4</sup>Médico Veterinário, Doutor, Professor Assistente, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Paraíba.

<sup>5</sup>Médico Veterinário, Professor Titular, Centro de Pesquisa CPDER, DCM, FMVZ, USP.

No Brasil, desde a primeira descrição, em bovinos, de linfossarcoma (RANGEL & MACHADO, 1943) e da comprovação científica da ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos (MERKT *et al.*, 1959; SANTOS *et al.*, 1959) vários estudos epidemiológicos foram conduzidos. A partir da análise crítica da literatura brasileira sobre a leucose enzoótica dos bovinos, BIRGEL JUNIOR *et al.* (1995) consideraram ser a taxa de prevalência da leucose dos bovinos, no Brasil, igual a 29,4%, estando esta enfermidade caracterizada como enzoótica em 11 Estados da Federação Brasileira: Acre, Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Rondônia e São Paulo.

Relacionado ao comportamento imunológico dos bovinos infectados pelo vírus da leucose dos bovinos encontra-se na literatura internacional compulsada um grupo de pesquisadores que acredita ser esta enfermidade responsável por distúrbios na síntese, secreção ou catabolismo da IgM, levando a uma diminuição dos valores de IgM (TRAININ *et al.*, 1973; TRAININ *et al.*, 1976; ATLURU *et al.*, 1979; MEIRON *et al.*, 1985; GATEI *et al.*, 1990). Entretanto, MATTHAEUS & STRAUB (1975) e MATTHAEUS (1978), relacionaram essa diminuição à presença de paraproteínas no soro de animais infectados, não havendo diminuição na síntese de IgM nos animais infectados pelo vírus da leucose dos bovinos, fato, também, observado por CREMONINI *et al.* (1984).

O assunto pouco foi pesquisado no Brasil havendo poucos trabalhos na literatura consultada. A pesquisa feita por GARCIA (1992) avaliou a resposta imune humoral e celular de bovinos sadios e infectados com o vírus da leucose dos bovinos. A resposta imune humoral foi avaliada através da imunização dos animais com vacina contra o vírus da febre aftosa e posteriores titulações semanais de anticorpos séricos contra o vírus da febre aftosa, ao longo de sete semanas, enquanto a resposta imune celular foi avaliada através da reação cutânea à tuberculina em bovinos naturalmente sensibilizados pelo *Mycobacterium sp.* GARCIA (1992) avaliou, também, o comportamento fenotípico dos linfócitos sanguíneos, através do emprego de quatro marcadores: imunoglobulinas de superfície, teste de formação de rosáceas, anticorpo monoclonal BLMo10 e anticorpo monoclonal M1. GARCIA (1992) concluiu que a leucose enzoótica dos bovinos não é responsável por variações imunológicas de natureza qualitativa ou funcional.

Recentemente BIRGEL *et al.* (1996), ao avaliarem o proteinograma de bovinos da raça

Jersey, infectados pelo vírus da leucose dos bovinos, criados em São Paulo, demonstraram a existência de diferenças estatisticamente significantes, sendo a taxa de albumina ( $3,61 \pm 0,41\text{g/d}\ell$ ) e a taxa da fração gamaglobulina ( $1,11 \pm 0,43\text{g/d}\ell$ ) obtida nos animais infectados pelo vírus da leucose dos bovinos maiores do que as taxas de albumina sérica ( $3,25 \pm 0,47\text{g/d}\ell$ ) e da fração gamaglobulina ( $0,94 \pm 0,37\text{g/d}\ell$ ) verificada nos animais sadios. Em contrapartida, o nível sérico da fração beta-2-globulina foi significativamente menor nos animais infectados ( $0,90 \pm 0,34\text{g/d}\ell$ ) quando comparados aos teores séricos encontrados para a fração beta-2-globulina de animais sadios ( $1,14 \pm 0,38\text{g/d}\ell$ ). A análise dos resultados permitiu afirmar que, em bovinos da raça Jersey, o teor sérico de proteína total, de alfa globulina e de beta-1-globulina não sofreram variações que pudessem ser atribuídas à influência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos (BIRGEL *et al.*, 1996).

A inexistência de trabalhos que avaliem a influência da infecção da leucose enzoótica dos bovinos sobre o proteinograma de bovinos da raça holandesa, bem como a ausência de pesquisas que quantifiquem as imunoglobulinas, em bovinos, criados nas condições brasileiras, motivaram a realização desta pesquisa.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a formação dos grupos experimentais, foram colhidas, por punção da veia jugular externa, amostras de sangue de 60 fêmeas bovinas da raça holandesa, sendo 20 fêmeas não reagentes ao antígeno gp-51 do vírus da leucose dos bovinos; 20 fêmeas reagentes ao antígeno gp-51 do vírus da leucose dos bovinos sem linfocitose; e 20 fêmeas reagentes antígeno gp-51 do vírus da leucose dos bovinos com linfocitose, conforme discriminado na tabela 1.

A seleção dos animais naturalmente infectados pelo vírus da leucose dos bovinos e dos animais não reagentes ao vírus da leucose dos bovinos foi realizada por meio de avaliação sorológica utilizando-se a prova de imunodifusão dupla de Ouchterlony, em gel de ágar, empregando-se o antígeno glicoprotéico (gp-51) da cápsula do vírus<sup>a</sup>, conforme a técnica descrita por BIRGEL (1982b) e modificada por D'ANGELINO (1991). A seleção dos animais com leucocitose por linfocitose e dos animais sem alterações do quadro leucocitário (sem linfocitose) foi realizada em amostras colhidas com etilenodiamino-tetracetato-disódica (EDTA Na<sub>2</sub>), através de contagens do número total de leucócitos, em

Tabela 1 - Caracterização dos grupos experimentais para avaliação da dinâmica das proteínas séricas de fêmeas bovinas da raça holandesa, criadas no Estado de São Paulo.

Variáveis	Grupo 1: não reagentes ao vírus da leucose dos bovinos	Grupo 2: reagentes ao vírus da leucose dos bovinos sem linfocitose	Grupo 3: reagentes ao vírus da leucose dos bovinos com linfocitose
Nº de animais	20	20	20
Idade (meses)	41,25 ± 13,33	47,00 ± 19,05	42,75 ± 14,34
Leucócitos	10.432 ± 1.857	10.765 ± 1.625	30.692 ± 6.210
Linfócitos	7.149 ± 1.778	7.103 ± 1.728	23.992 ± 6.892

Câmara de Neubauer modificada, utilizando-se como solução diluidora o líquido de Thoma e a contagem diferencial de leucócitos em esfregaços sanguíneos corados pelo Corante de Rosenfeld, conforme a metodologia padronizada por BIRGEL (1982a).

As amostras de soro sanguíneo, destinadas à determinação do proteinograma e à quantificação das imunoglobulinas, foram colhidas em tubos de vidro siliconizados, com vácuo suficiente para aspirar 10ml de sangue, sendo as amostras mantidas em temperatura ambiente até a coagulação. A seguir, os soros foram separados por centrifugação a 1000g, durante 15 minutos e transferidos para frascos de vidro, estéreis e secos, sendo conservados em congelador a -20°C até a realização dos exames.

A determinação dos teores séricos de proteína total foi feita através do método do biureto, de acordo com técnica preconizada por GORNALL *et al.* (1949) e modificada por STRUFALDI (1987). A migração eletroforética para a separação das frações protéicas do soro sanguíneo foi realizada em fitas de celulose, sendo a leitura das frações albumina, alfa globulina, beta globulina e gama globulina efetuadas por densitometria, conforme a técnica descrita por SOUZA (1997). A determinação das imunoglobulinas séricas foi feita segundo a técnica de MANCINI *et al.* (1965), utilizando-se placas de ágar incorporadas com anti-soros específicos para as classes de imunoglobulinas<sup>b</sup> IgG e IgM de bovinos.

Para a análise estatística dos resultados foi

utilizado o programa de estatística SAS - Statistical Analysis System, sendo os resultados submetidos à análise de variância e o contraste das médias analisado pelo Teste de Duncan, ambos os testes com níveis de significância igual a 5% ( $p < 0,05$ ), conforme recomendam BERQUÓ *et al.* (1981).

## RESULTADOS

Os resultados da avaliação da influência da infecção pelo vírus da leucose enzoótica dos bovinos sobre o proteinograma de bovinos da raça holandesa estão apresentados na tabela 2, sendo que, nas condições em que o experimento foi desenvolvido, não puderam ser observadas diferenças estatisticamente significantes. Os resultados da influência da infecção da leucose enzoótica dos bovinos sobre os valores das imunoglobulinas séricas IgG e IgM estão apresentados na tabela 3, não sendo constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos experimentais.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Para as condições em que foi realizada esta pesquisa, não houve influência da infecção pelo

Tabela 2 - Teores séricos médios, desvio padrão e amplitude de variação do proteinograma de bovinos da raça holandesa não reagentes ao antígeno gp-51 do vírus da leucose dos bovinos, reagentes ao antígeno gp-51 do vírus da leucose dos bovinos sem linfocitose e reagentes antígeno gp-51 do vírus da leucose dos bovinos com linfocitose.

	Grupos experimentais		
	Grupo 1: não reagentes ao vírus da leucose dos bovinos	Grupo 2: reagentes ao vírus da leucose dos bovinos sem linfocitose	Grupo 3: reagentes ao vírus da leucose dos bovinos com linfocitose
Nº. de animais	20	20	20
Proteína total (g/dl)	8,01 ± 0,53 <sup>a</sup> (6,70 - 9,20)	8,02 ± 0,55 <sup>a</sup> (6,80 - 9,00)	7,85 ± 0,44 <sup>a</sup> (7,00 - 8,80)
Albumina (g/dl)	3,46 ± 0,43 <sup>a</sup> (2,32 - 4,25)	3,50 ± 0,30 <sup>a</sup> (2,73 - 4,15)	3,41 ± 0,39 <sup>a</sup> (2,38 - 4,20)
Alfa globulina (g/dl)	0,79 ± 0,27 <sup>a</sup> (0,40 - 1,55)	0,81 ± 0,17 <sup>a</sup> (0,57 - 1,20)	0,80 ± 0,20 <sup>a</sup> (0,37 - 1,22)
Beta globulina (g/dl)	0,90 ± 0,20 <sup>a</sup> (0,54 - 1,30)	0,96 ± 0,15 <sup>a</sup> (0,70 - 1,26)	0,90 ± 0,08 <sup>a</sup> (0,77 - 1,08)
Gama globulina (g/dl)	2,84 ± 0,64 <sup>a</sup> (1,70 - 4,17)	2,74 ± 0,56 <sup>a</sup> (2,01 - 4,48)	2,71 ± 0,59 <sup>a</sup> (1,80 - 4,10)
Relação albumina- globulinas	0,78 ± 0,18 <sup>a</sup> (0,39 - 1,16)	0,79 ± 0,14 <sup>a</sup> (0,44 - 1,07)	0,78 ± 0,16 <sup>a</sup> (0,43 - 1,16)

<sup>a</sup> letras coincidentes, na mesma linha, significam diferença estatística não significativa ( $p > 0,05$ ) - Teste de Duncan.

Tabela 3 - Teores séricos médios, desvio padrão e amplitude de variação das imunoglobulinas IgG e IgM de bovinos da raça holandesa não reagentes ao antígeno gp-51 do vírus da leucose dos bovinos, reagentes ao antígeno gp-51 do vírus da leucose dos bovinos sem linfocitose e reagentes antígeno gp-51 do vírus da leucose dos bovinos com linfocitose.

	Grupos experimentais		
	Grupo 1: não reagentes ao vírus da leucose dos bovinos	Grupo 2: reagentes ao vírus da leucose dos bovinos sem linfocitose	Grupo 3: reagentes ao vírus da leucose dos bovinos com linfocitose
Nº. de animais	20	20	20
Ig G (mg/dℓ)	3.431 ± 842 <sup>a</sup> (2.268 - 5.880)	3.710 ± 1.174 <sup>a</sup> (1.680 - 7.665)	4.275 ± 1.428 <sup>a</sup> (1.680 - 7.035)
Ig M (mg/dℓ)	317 ± 143 <sup>a</sup> (150 - 600)	323 ± 167 <sup>a</sup> (10 - 720)	289 ± 130 <sup>a</sup> (100 - 550)

<sup>a</sup> letras coincidentes, na mesma linha, significam diferença estatística não significativa (p>0,05) Teste de Duncan.

vírus da leucose dos bovinos sobre o proteinograma de fêmeas bovinas da raça holandesa. Desta forma, não foram confirmados os resultados anteriores obtidos por BIRGEL *et al.* (1996), que ao avaliarem os resultados do proteinograma sérico de bovinos da raça Jersey, criados em São Paulo, concluíram que a infecção pelo vírus da leucose dos bovinos é responsável por diferenças estatísticas significantes no proteinograma. Estas diferenças, entretanto, mesmo quando presentes, são de pequena magnitude, e como já fora salientado por MATTHAEUS & STRAUB (1965), insuficientes para que o proteinograma seja utilizado no diagnóstico da leucose enzoótica dos bovinos. Com base nas observações obtidas nesta pesquisa e na avaliação crítica da literatura compulsada demonstra-se que na avaliação das disproteinemias, em bovinos, a infecção pelo vírus da leucose dos bovinos é fator de pouca influência quantitativa, podendo mesmo ser esta influência desconsiderada.

Os resultados desta pesquisa demonstraram não haver diferenças nas concentrações séricas das imunoglobulinas IgM, em fêmeas bovinas da raça holandesa sadias ou infectadas pelo vírus da leucose dos bovinos, resultados estes que estão em concordância com as observações de MATTHAEUS & STRAUB (1975), MATTHAEUS (1978) e CREMONINI *et al.* (1984). Na presente pesquisa, não foram observados os distúrbios relacionados ao metabolismo da IgM citados por outros autores (TRAININ *et al.*, 1973; TRAININ *et al.*, 1976; ATLURU *et al.*, 1979; MEIRON *et al.*, 1985; GATEI *et al.*, 1990). Relativo às concentrações de IgG, os resultados desta pesquisa demonstraram que não houve influência da

infecção pelo vírus da leucose dos bovinos, estando esses resultados em concordância com a literatura compulsada (TRAININ *et al.*, 1973; TRAININ *et al.*, 1976; MATTHAEUS & STRAUB, 1975, MATTHAEUS, 1978; ATLURU *et al.*, 1979; CREMONINI *et al.*, 1984; MEIRON *et al.*, 1985; GATEI *et al.*, 1990).

As pesquisas desenvolvidas por GARCIA não puderam comprovar variações imunológicas de natureza qualitativa ou funcional. Foi sugerido por GARCIA (1992) que a leucose enzoótica é responsável apenas por variações imunológicas de natureza quantitativa, fato este que os resultados obtidos nesta pesquisa não puderam demonstrar. Apesar de a infecção pelo vírus da leucose dos bovinos ser um

fator de influência para o descarte de bovinos, com os animais infectados sendo descartados com idade menor do que a idade média para o descarte de animais sadios (BIRGEL *et al.* 1983), e a produção leiteira dos animais infectados reduzida em 11% (D'ANGELINO, 1991), até o presente momento não foi possível uma demonstração de ser a Leucose Enzoótica dos Bovinos uma retrovírose que provoque imunossupressão, como a observada nas retrovíroses dos gatos (WITTMANN & STARICK, 1993). Esta dificuldade em se provar esses efeitos imunossupressivos está relacionada, possivelmente, aos modelos experimentais empregados.

## FONTES DE AQUISIÇÃO

<sup>a</sup> Leukassay – B Pitman Moore Inc.

<sup>b</sup> Bovine IgG e Bovine IgM Kits do Saikin Kagafu Institute CO, LTD.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATLURU, D., JOHNSON, D.W., PAUL, P.S. *et al.* B-lymphocyte differentiation, using pokeweed mitogen stimulation: in vitro studies in leukemic and normal cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.40, p.515-520, 1979.
- BERQUÓ, E.S., SOUZA, J.M.P., GOTLIEB, S.L.D. **Bioestatística**. São Paulo : Pedagógica e Universitária, 1981. 256p.
- BIRGEL, E.H. Hematologia clínica veterinária. In: BIRGEL, E.H., BENESI, F.J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo : Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982a. p.2-50.

- BIRGEL, E.H. Leucose enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnósticos. In: BIRGEL, E.H., BENESI, F.J. **Patologia clínica veterinária**. São Paulo : Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982b. p.249-260.
- BIRGEL, E.H., BENESI, F.J., D'ANGELINO, J.L., *et al.* 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 FMVZ-USP, 1983, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo : FMVZ-USP, 1983. V.2, p.71.
- BIRGEL, E.H., GREGORY, L., BIRGEL JUNIOR, E.H., *et al.* Avaliação da influência da infecção pelo vírus da Leucose dos Bovinos (VLB) sobre a função hepática e renal de animais da raça Jersey. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 424, 1996, Goiânia, Go. **Anais...** Goiânia : Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária, 1996. p.166-167.
- BIRGEL JUNIOR, E.H., D'ANGELINO, J.L., BENESI, F.J., *et al.* Prevalência da infecção pelo vírus leucose dos bovinos, em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.15, n.4, p.93-99, 1995.
- CREMONINI, A.M., BERGAMINI, P.F., CALDORA, C., *et al.* Valutazione dell'anticorpoiesi in bovini infetti da BLV. **Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie**, v.38, p.698-700, 1984.
- D'ANGELINO, J.L. **Leucose enzoótica dos bovinos. Estudo retrospectivo da performance produtiva e reprodutiva de animais infectados e não infectados**. São Paulo – SP, 1991. 85p. Tese (Livre-docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1991.
- GARCIA, M. **Avaliação da resposta imunitária em bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose**. São Paulo – SP, 1992. 60p. Tese (Doutoramento) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1992.
- GATEI, M.H., LAVIN, M.F., DANIEL, R.C.W. Serum immunoglobulin concentrations in cattle naturally infected with bovine leukemia virus. **Journal of Veterinary Medicine**, v.37B, p.575-580, 1990.
- GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v.177, p.751-766, 1949.
- MANCINI, G., CARBONARA, A.O., HEREMANS, J.F. Immunochemical quantification of antigens by single radial immunodiffusion. **Internacional Journal of Immunochemistry**, v.2, p.235-254, 1965.
- MATTHAEUS, W., STRAUB, O.C. Serumelektrophoretische und hämatologische Befunde bei gesunden, an Leukose und MKS erkrankten Rindern. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**, v.78, p.421, 1965.
- MATTHAEUS, W., STRAUB, O.C. Das Serum- $\gamma$ -Globulinbild bei leukosekranken Rindern und Schafen. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, v.22B, p.758-763, 1975.
- MATTHAEUS, W. Heterogeneous properties of BLV-precipitating immunoglobulins in bovine leukemic sera. **Annales des Recherches Vétérinaires**, v.9, p.635-641, 1978.
- MEIRON, R., BRENNER, J., GLUCKMAN, A., *et al.* Humoral and cellular responses in calves experimentally infected with bovine Leukemia Virus (BLV). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.9, p.105-114, 1985.
- MERKT, H., GIUDICE, J.C.O., MÜLLER, J.A. Leucose bovina: concepção moderna e primeira verificação da doença no RS. **Rev Esc Agron Vet RG Sul**, v.2, p.7-19, 1959.
- RANGEL, N.M., MACHADO, A.V. Contribuição à oncologia comparada em Minas Gerais. **Arq Esc Sup Vet Est Minas Gerais**, v.1, p.83-96, 1943.
- SAS INSTITUTE. **Sas user's guide: statistics**. Cary : SAS Institute, 1985. 956p.
- SANTOS, J.A., PINHEIRO, P.V., SILVA, L.J. Linfossarcoma com lesões da língua e câmaras cardíacas em bovinos. **Anais da Escola Fluminense de Medicina Veterinária**, v.2, p.1-8, 1959.
- SOUZA, P.M. **Perfil bioquímico sérico de bovinos das raças gir, holandesa e girolanda, criados no Estado de São Paulo. Influência de fatores de variabilidade etários e sexuais**. São Paulo – SP, 1997. 168p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1997.
- STRUFALDI, B. **Prática de bioquímica clínica**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1987. 399p.
- TRAININ, Z., MAIROM, R., KLOPFER, U., *et al.* Levels of IgM and IgG in the sera of normal and leukaemic cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v.83, p.87-90, 1973.
- TRAININ, Z., UNGAR-WARON, H., MEIROM, R., *et al.* IgG and IgM antibodies in normal and leukaemic cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v.86., p.571-580, 1976.
- WITTMANN, W., STARICK, E. Immunologie. In: WITTMANN, W. **Leukosen der wiederkäuer**. Stuttgart : Gustav Fischer Verlag Jena, 1993. p.113-115.