

LEUCOSE BOVINA: CARACTERIZAÇÃO DO PROTEINOGRAMA ELETROFORÉTICO EM DOIS REBANHOS IDENTIFICADOS COMO SOROPOSITIVOS E COM LINFOCITOSE PERSISTENTE*

A.R. Oliveira¹, P.E.A. Machado², L.B. Kroll², C.M. Correia³

¹Universidade de Cuiabá (UNIC), Av. Beira Rio, 3.100, CEP 78015-480, Cuiabá, MT, Brasil

RESUMO

Após determinações leucolinfocitárias e imunológicas, foram selecionados 30 bovinos de duas propriedades próximas uma da outra, no interior do Estado de São Paulo. Destes foram constituídos três grupos de 10 bovinos cada: grupo um, animais não reagentes aos antígenos do VLB; grupo dois, animais reagentes aos antígenos do vírus da leucose bovina (VLB), e o grupo três reagentes que apresentavam linfocitose persistente (LP). A reatividade para os antígenos do VLB foi determinada por meio de imunodifusão em ágar gel, e a linfocitose persistente foi determinada através de quatro contagens leucolinfocitárias. Sugere-se que bovinos com linfócitos entre 6.500 a 8.000/ μ L sejam considerados LP. Sugere-se também que a prevalência da doença depende diretamente de fatores próprios na constituição de cada rebanho. O eritograma e a contagem de plaquetas permaneceram dentro da faixa de normalidade para a raça. Bovinos reagentes aos antígenos do VLB e também os reagentes com LP apresentaram diminuição das proteínas plasmáticas totais, e da fração gamaglobulina no sangue periférico.

PALAVRAS-CHAVE: Leucose bovina, leucocitose persistente, proteinograma, eritograma.

ABSTRACT

BOVINE LEUKOSIS: CHARACTERIZATION OF THE ELETROPHORETIC PROTEINOGRAM IN TWO HERDS IDENTIFIED AS SERUM POSITIVE AND PERSISTENT LYNPHOCYTOSIS. After leukocytes, lymphocytes and immulogics determinations, a group of 30 bovines were selected from two farms near to each other, localized in São Paulo State, three different groups were formed as follows: group 1 animals nonreagents to the antigens of the virus of the bovine leucose(VLB); group 2, animals reagents to the antigens of the VLB, and group 3, animals reagents to VLB and with persistent linfocitose (PL). Reactivity to bovine leukaemia virus (BLV) was determined by immunodiffusion agar gel (IDAG). Persistent lymphocytosis (PL) was determined by leucocyte and lymphocyte countings between 6.500 - 8.000/ μ L represent suspicion and above 8.000/ μ L positive for PL. The results also suggested that the disease prevalence depends upon directly to the normality for the herd. The erithrogram and platelet counting, remained whithin the normality for the race. Bovines antigens reativity for BLV, and PL, showed decrease in the total counting of plasmatic protein and gamaglobulin.

KEY WORDS: Bovine leukosis, persistent lymphocytosis, proteinogram, erithrogram.

²Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista

³Faculdade de Medicina Veterinária de Botucatu – Universidade Estadual Paulista

* Financiado parcialmente pela CAPES

INTRODUÇÃO

Os bovinos infectados com o vírus da leucose bovina desenvolvem a leucose enzootica bovina (LEB), enfermidade que pode causar baixas na defesa imune humoral, desenvolver linfocitose persistente (LP) e o linfoma. Tem sido observada a queda de IgM nos animais infectados e com LP (MEIRON *et al.*, 1984; GATEI *et al.*, 1990). As populações de células T e as subpopulações Bo_4 e Bo_8 são reduzidas significativamente (GATEI *et al.*, 1989). Estas observações podem ser interpretadas como sendo capazes de levar o animal a uma imunossupressão. Porcentagem variável de animais soropositivos para o VLB, isto é, 30 a 70% desenvolvem uma linfoproliferação policlonal de linfócitos B, em resposta à estimulação de proteínas antigênicas do VLB, caracterizada por uma LP, onde o equilíbrio quantitativo entre células B e T se altera, as células B aumentam em número e as T diminuem, podendo haver ou não aumento do número de linfócitos circulantes (BURNY *et al.*, 1985; KOYAMA *et al.*, 1983; KENYON & PIPER, 1977; WILLIAMS *et al.*, 1988; TAYLOR *et al.*, 1992; GARCIA 1992). Um pequeno número de até 10% pode atingir o estágio linfomatoso (GHYSDAEL *et al.*, 1984; FOSSUM *et al.*, 1988). Para a instalação do linfoma, só é necessário a infecção pelo VLB, fatores genéticos e o ambiente (ABT *et al.*, 1976).

Neste estudo objetivamos caracterizar dois grupos de bovinos oriundos de duas fazendas, sendo um soropositivo para os antígenos do VLB, e o outro, para os que desenvolveram a LP, além da determinação de eritrograma, da contagem de plaquetas, e do comportamento do proteinograma eletroforético nestes grupos animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 30 bovinos da raça holandesa preto e branco, do sexo feminino com idades variando entre 3 a 12 anos, pertencentes a duas fazendas equidistantes 40 km. Esses animais foram divididos em três grupos, obedecendo-se os seguintes critérios: grupo um, composto de 10 bovinos com idades entre 4 e 7 anos, oriundos da Fazenda I, não reagentes aos antígenos do VLB, e isentos de sinais ou sintomas clínicos da enfermidade ou outros quaisquer; grupo dois, formado por bovinos com idades entre 3 a 12

anos, oriundos da Fazenda II, reagentes aos antígenos do VLB, mas sem LP. Estes animais não apresentavam sinais ou sintomas da enfermidade ou outros, incluindo linfomas. Grupo três reuniu 10 bovinos com idade entre 3 a 9 anos, também oriundos da Fazenda II, reagentes aos antígenos do VLB e apresentando LP. Para firmar a formação destes grupos foram realizados quatro determinações leucolinfocitárias com intervalos mínimo de 35 dias.

O sangue era obtido adequadamente em duas porções, uma era destinada à leucometria, eritrometria e a contagem de plaquetas e a outra era destinada à obtenção de soro sanguíneo, para a pesquisa de anticorpos anti VLB, cujo antígeno usado foi a glicoproteína do envelope viral (Gp 60), obtidas em cultivo de células de rim fetal de ovelhas infectadas com o VLB, e o processamento eletroforético foi realizado em suporte de agarose para separações das globulinas e da albumina (reagente obtido no comércio Celmigel®). As proteínas plasmáticas totais foram mensuradas através do método Biureto (reagente obtido no comércio Celm® A/G).

O tratamento estatístico deu-se através da análise dos dados obtidos, onde foi processada com o emprego do delineamento inteiramente ao acaso conforme tabela abaixo:

Causa da variação	GL
Tratamento	I - 1
Resíduo	J (I - 1)
Total	IJ - 1

I = é o número de tratamento.

J = é o número de repetição por tratamento.

Sempre que o valor da estatística F foi significativo empregou-se o método de Tukey para comparação de média conforme recomenda BANZATTO & KRONKA, 1989.

RESULTADOS

Os resultados acham-se expostos nas Tabelas de número 1 a 8 e na Figura 1, as quais mostram a análise descritiva de contagem de eritrócitos, plaquetas e leucócitos totais e linfócitos e o resultado do proteinograma eletroforético, além de uma bimodal que descreve o comportamento apenas dos linfócitos.

Tabela 1 – Eritograma e contagem de plaquetas nos três grupos.

Grupos	Eritrócitos (μ L)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	Plaquetas (μ L)
Normais (n=10)	5.842.000	29,21	10,168	402.000
Soropositivos (n=10)	5.204.000	25,44	9,038	457.000
Linfocitose (n=10)	5.811.000	26,78	9,670	553.000

Eritrócitos	F=3,80	P < 0,05	Gp ₂ < (Gp ₁ = Gp ₃)	
Hematócrito	F=4,31	P < 0,05	Gp ₂ < Gp ₁ e Gp ₃ intermediário	
Hemoglobina	F=2,46	P < 0,05	Gp ₁ = Gp ₂ = Gp ₃	
Plaquetas	F=1,16	P < 0,01	Gp ₁ < (Gp ₂ = Gp ₃)	

DISCUSSÃO

Houve dificuldade na caracterização do grupo não reagente, visto que 100% dos animais da 1ª fazenda eram soropositivos. O fato de conseguir em uma fazenda próxima, os animais que constituíram o grupo 1 - bovinos não reagentes, onde foi observado 80% de animais soronegativos podemos inferir que a prevalência da doença não está relacionada tão somente à região estudada e sim, características próprias, na formação de cada rebanho, fato já constatado por BURNY *et al.* (1985).

A distribuição da frequência de valores absolutos de linfócitos em todos os bovinos estudados mostra uma distribuição bimodal, caracterizando dois picos onde os valores linfocitários diferentes nos dois primeiros grupos, isto é, os bovinos não reagentes e os apenas reagentes, se encontram na primeira moda, na faixa dos 7.500/ μ L, portanto dentro de valores representativos para a raça holandesa (SHALM *et al.*, 1975). Na segunda moda concentrou-se todos os animais reagentes com LP (Gráfico 1), com números de linfócitos acima de 9.000/ μ L, nesta concentram-se todos os animais coincidindo com os estudos de BURNY *et al.* (1985), WILLIAMS *et al.* (1988) e GATEI *et al.* (1989). É relatado por TAYLOR & JACOBS (1993) a existência de uma atividade bloqueadora da expressão do VLB no soro de reagentes, sugerindo então que esta atividade estaria ligada à regulação da latência viral e na expressão do provírus, o que explicaria a LP geneticamente controlado.

O comportamento do eritograma e a contagem de plaquetas representadas na Tabela 1 mostram que apesar de haver diferenças estatisticamente significante no grupo dois (reagentes), com maiores médias para

eritrócitos e hematócitos, e no grupo um (não reagentes), com médias mais altas para hemoglobina e plaquetas, os valores médios nos três grupos estão dentro da faixa da normalidade para a raça (SHALM *et al.*, 1975). Esses valores não foram alterados pela virose.

A análise do proteinograma descrito nas Tabelas 5 a 8 mostram médias de proteínas totais no grupo um, significativamente maiores que nos grupos dois e três; estas diferenças podem ser explicadas devido a alta produtividade leiteira dos dois últimos grupos, além de um manejo alimentar inadequado ou insuficiente.

Entretanto, a diminuição significativa das gama globulinas nos grupos dois e três tem explicações nos estudos de MEIRON *et al.* (1985) e GATEI *et al.* (1990), que observaram queda de IgM (componente da fração gama) no soro de bovinos infectados e infectados com LP, podendo significar uma queda da imunidade humoral.

Tabela 2 – Resultado da contagem de leucócitos totais, linfócitos absolutos e de prova de IDAG para detectar anticorpos anti VLB do grupo de bovinos normais.

	Leucócito totais	Linfócito totais	IDAG VLB
1. Andorinha	9.400	5.922	não reagente
2. Maneira	9.400	5.734	não reagente
3. Soberana	8.800	5.808	não reagente
4. Idéia	9.600	5.760	não reagente
5. Pintinha	10.050	5.829	não reagente
6. Princesa	8.400	5.292	não reagente
7. Preta	10.150	5.987	não reagente
8. Havaiana	7.000	5.110	não reagente
9. Madame	8.100	5.751	não reagente
10. Jandaia	8.700	5.916	não reagente

* A idade dos animais acima variou de três a sete anos

Tabela 3 - Resultados da 1ª e 2ª contagens de leucócitos totais, linfócitos absolutos e da 1ª prova de IDAG grupo de bovinos reagentes ao anticorpos do VLB sem LP.

	Leucócitos totais		Linfócitos totais		IDAG – VLB	Idade
	1ª	2ª	1ª	2ª		
	Contagem	Contagem	Contagem	Contagem		
11. Ravena	11.100	10.400	6.327	6.240	Reagente	9,11
12. Dalva	10.800	9.400	5.932	6.372	Reagente	4,2
13. Adelina	11.300	10.050	5.876	5.628	Reagente	6,9
14. F. Branc	10.300	10.650	6.283	6.816	Reagente	12,5
15. Fabiana	10.700	9.800	5.871	6.634	Reagente	3,1
16. Livia	7.400	9.200	4.585	5.888	Reagente	7,8
17. Palmita	9.900	8.200	6.138	5.484	Reagente	10,0
18. Hinista	10.050	8.500	6.130	5.270	Reagente	9,0
19. Rocha	9.400	8.000	4.640	5.120	Reagente	6,5
20. Seiva	13.600	9.100	6.672	5.187	Reagente	8,8

Tabela 4 - Resultados da 1ª, 2ª, 3ª e 4ª contagens de leucócitos totais, linfócitos absolutos e da prova de IDAG grupo de bovinos reagentes ao anticorpos do VLB com LP.

	Leucócitos totais				Linfócitos totais				Prova	Idade
									IDAG	(anos)
	Contagens				Contagens					
	1ª	2ª	3ª	4ª	1ª	2ª	3ª	4ª		
Estima	16.700	16.800	17.500	17.000	12.692	11.928	12.600	12.920	Reagentes	5,8
Fama	15.900	15.000	13.600	13.450	13.674	12.150	10.472	10.492	Reagentes	7,6
Bonanza	16.600	20.100	14.900	13.900	12.948	15.672	11.026	11.815	Reagentes	4,2
Ladeira	24.400	25.200	23.300	25.550	18.278	18.396	19.106	19.162	Reagentes	7,5
Midas	18.250	11.200	13.300	14.650	9.855	7.616	10.241	11.720	Reagentes	3,6
Pombinha	19.000	17.300	18.200	20.100	16.150	12.629	15.470	15.879	Reagentes	8,1
Preta	19.450	24.800	19.200	21.100	14.587	13.920	14.976	16.458	Reagentes	3,7
Bandeira	18.250	20.500	24.600	20.100	15.695	16.195	18.450	15.708	Reagentes	4,4
Katiane	20.350	18.500	18.700	21.150	16.076	14.060	14.588	17.343	Reagentes	4,9
Camila	17.950	14.700	17.800	19.150	11.308	10.731	14.952	14.362	Reagentes	3,9

Tabela 5 – Proteinograma eletroforético: valores encontrados no grupo um, bovinos não reagentes ao antígeno do VLB.

	PT	Albumina		Alfa 1		Alfa 2		Beta		Gama		A/G
		AB	%	AB	%	AB	%	AB	%	AB	%	
01. Andorinha	7,3	1,74	23,8	0,27	3,7	0,35	4,8	0,63	8,6	4,31	59,1	0,31
02. Maneira	10,5	5,16	49,1	0,42	4,0	0,43	4,1	0,57	5,0	3,96	37,8	0,96
03. Soberana	7,5	2,66	35,4	0,37	5,0	0,40	5,3	0,83	11,1	3,24	43,2	0,55
04. Idéia	7,9	2,76	34,9	0,14	1,8	0,17	2,2	0,68	8,5	3,84	48,7	0,57
05. Pintinha	7,8	2,56	33,0	0,37	4,7	0,39	5,0	0,62	7,9	3,26	41,7	0,55
06. Princesa	6,4	2,60	40,6	0,32	5,0	0,35	5,5	0,53	8,3	2,51	40,6	0,70
07. Preta	10,5	3,60	34,9	0,23	2,2	0,30	2,9	0,76	7,3	5,53	52,7	0,53
08. Havaiana	8,0	3,54	44,2	0,30	3,8	0,38	4,7	0,67	8,4	3,11	38,9	0,79
09. Madame	10,4	4,50	43,2	0,34	3,3	0,58	5,6	0,72	6,9	4,25	40,8	0,76
10. Jandaia	6,1	2,32	38,4	0,19	3,1	0,37	5,9	0,48	7,8	2,74	44,8	0,61

Tabela 6 – Proteinograma eletroforético: valores encontrados no grupo dois, bovinos reagentes ao antígeno do VLB.

	PT	Albumina		Alfa 1		Alfa 2		Beta		Gama		A/G
		AB	%	AB	%	AB	%	AB	%	AB	%	
11. Ravena	6,3	2,39	37,8	0,24	3,9	0,37	5,9	0,54	8,6	2,76	43,8	0,61
12. Dalva	7,2	2,94	40,7	0,22	3,1	0,47	6,5	0,57	0,8	3,0	41,7	0,69
13. Adelina	5,9	2,98	50,3	0,22	3,7	0,36	6,2	0,12	2,1	2,2	37,7	1,03
14. F. Branca	7,3	2,92	40,0	0,21	2,8	0,36	5,0	0,84	11,5	2,97	40,7	0,67
15. Fabiana	6,4	2,71	42,2	0,15	2,4	0,26	4,1	0,38	5,9	2,90	45,4	0,73
16. Livia	7,2	3,06	42,6	0,11	1,6	0,32	4,5	0,65	5,0	3,05	42,3	0,74
17. Palmita	6,2	2,69	43,4	0,10	1,6	0,21	3,6	0,36	5,7	2,84	45,8	0,76
18. Hinista	6,6	2,74	41,5	0,11	1,6	0,39	6,0	0,85	13,5	2,47	37,4	0,28
19. Rocha	6,6	2,78	42,1	0,18	2,7	0,27	4,1	0,82	12,4	2,55	38,7	0,73
20. Seiva	7,2	2,40	33,2	0,27	3,8	0,39	5,4	0,69	9,6	3,45	47,9	0,50

Tabela 7 – Proteinograma eletroforético: valores encontrados no grupo três, bovinos reagentes ao antígeno do VLB com LP.

	PT	Albumina		Alfa 1		Alfa 2		Beta		Gama		A/G
		AB	%	AB	%	AB	%	AB	%	AB	%	
21. Estima	6,2	3,12	50,4	0,14	2,2	0,32	5,2	0,43	7,0	2,19	35,2	1,01
22. Fama	6,0	2,21	36,7	0,15	2,6	0,25	4,2	0,55	9,2	2,84	37,3	0,58
23. Bonanza	7,1	3,14	4,41	0,20	2,8	0,33	4,7	0,68	9,6	2,75	38,8	0,79
24. Ladeira	7,4	6,83	49,8	0,13	1,7	0,20	2,7	0,32	4,4	3,6	41,4	1,60
25. Midas	6,6	2,93	44,3	0,18	2,7	0,42	6,4	0,61	9,3	2,46	37,3	0,80
26. Pombinha	7,3	3,38	47,0	0,21	2,8	0,24	3,6	0,57	7,6	2,87	39,3	0,87
27. Preta	7,0	2,7	38,6	0,30	4,3	0,49	7,0	0,97	13,9	2,54	36,2	0,63
28. Bandeira	6,9	2,95	42,7	0,18	2,6	0,38	5,5	0,61	8,8	4,04	2,78	0,57
29. Katiane	6,6	3,63	55,0	0,12	1,8	0,27	4,1	0,58	8,8	2,0	30,3	1,22
30. Camila	6,4	2,83	44,5	0,25	3,9	0,41	6,4	0,64	9,9	2,27	35,3	0,79

Tabela 8 – Análise dos valores encontrados no proteinograma eletroforético (médias e teste de Tukey) dos três grupos: normais, reagentes ao antígeno do VLB e reagentes com LP.

	Normais	Reagentes	Reagentes com LP	Teste de Tukey
	Gp ₁	Gp ₂	Gp ₃	
Prot. Totais	8,24	6,75	6,69	Gp ₁ > (Gp ₂ = Gp ₃)
Albumina	3,14	2,76	3,37	Gp ₁ = Gp ₂ = Gp ₃
α ₁	0,29	0,18	0,19	Gp ₁ > (Gp ₃ = Gp ₂)
α ₂	0,37	0,34	0,33	Gp ₁ = Gp ₂ = Gp ₃
β	0,64	0,59	0,58	Gp ₁ = Gp ₂ = Gp ₃
γ	3,67	2,82	2,76	Gp ₁ > (Gp ₂ = Gp ₃)
A/G	0,63	0,67	0,88	Gp ₁ = Gp ₂ = Gp ₃

CONCLUSÕES

Os valores de linfócitos absolutos determinados nos bovinos diagnosticados com LP permitem considerar

que bovinos com mais de 3,7 anos de idade e que apresentaram número de linfócitos absolutos entre 6.500 a 8.000/ μ L sejam considerados suspeitos, e os com mais de 8.000/ μ L sejam admitidos como LP, ou linfocitóticos.

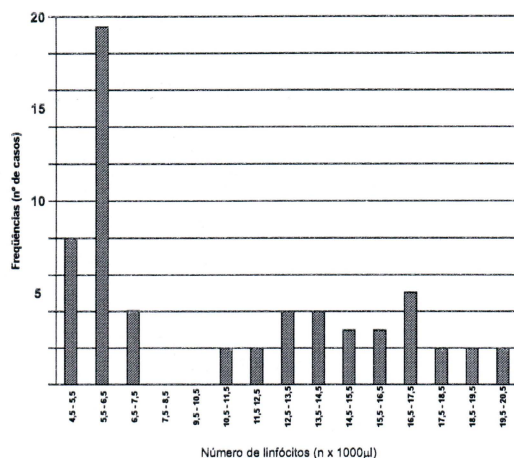


Fig. 1 - Distribuição de frequência de linfócitos de sangue periférico em animais reagentes e não reagentes aos antígenos VLB.

A prevalência da doença depende diretamente de fatores próprios da constituição de cada rebanho.

A distribuição bimodal da frequência de linfócitos periféricos analisados nos três grupos permite inferir a existência de fator genético que acompanha a LP, observada em animais soropositivos, reforçando os dados de literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABT, D.N.; MARSHA, K.R.R.; FERRER, J.P.; PIPER, C.E.; BHATT, D.M. Studies of persistent lymphocytosis and infection, with the bovine C-tipe leukaemia virus (BLV) in cattle. *Vet. Microbiol.*, v. 1, p. 278-300, 1976.
- BANZATTO, A D. & KRONCA, N. S. *Experimentação agrícola*. Piracicaba: FUNEP, 1989, p. 247.
- BURNY, A; BRUCK, C.; CREUTER, Y.; COLLEZ, D.; DESCHAMPS, J.; GHYSDAEL, J.; GREGOIRE, D.; KETTMANN, R.; MAMMERICKX, M.; MARBAIX, G.; PORTELLE, D. Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukorize. *Ondestepoort J. Vet. Res.*, v. 52, p. 133-144, 1985.
- FOSSUM, C.; BURNY, A.; PORTELLE, D.; MAMMERICKX, M.; MOREN, B. Detection of B and T cell, with lecithins or antibodies, in healthy and bovine leukemia virus - infected cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 18, p. 269-278, 1988.
- GARCIA, M. *Avaliação da resposta imunitária em bovinos naturalmente infectados pelo vírus da leucose*. São Paulo, 1992, 60p. [Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo].
- GATEI, M.H.; BRANDON, R.B.; NAIF, H.M.; MCLENNAN, M.W.; DANIEL, C.W.; LAVIN, M.F. Changes in B and T cell subsets in bovine leukaemia virus infected cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 23, p. 139-147, 1989.
- GATEI, M.H.; LAVIN, M.F.; DANIEL, R.C.N. Serum immunoglobulin concentration in cattle naturally infected with bovine leukaemia virus. *J. Vet. Med. Ser. B.*, v. 37, p. 575-580, 1990.
- GHYSADEL, J.; BRUCK, C.; KETTMANN, R.; BURNY, A. Bovine leukemia virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, v. 12, p. 1-19, 1984.
- KENYON, S.J. & PIPER, C.E. Cellular basis of persistent lymphocytosis in cattle infected with bovine leukemia virus. *Infect. Immun.*, v. 16, p. 891-897, 1977.
- KOYAMA, H.; NAKANISHI, H.; KAJIKAWA, O.; YOSHIKAWA, H.; TSUBAKI, S.; YOSHIKAWA, T.; SAITO, H. T and B lymphocytes in persistent lymphocytotic and leukemic cattle. *Jan. J. Vet. Sci.*, v. 45, p. 471-475, 1983.
- MEIRON, R.; BRENNER, J.; GLUCKMAN, A.; AVRAHAM, R.; TRAIMIN, Z. Humoral and cellular responses in calves experimentally infected with bovine leukemia virus (BLV). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 9, p. 105-114, 1984.
- SHALM, W.O.; JAIN, B.V.; CARROL, E. J. *Veterinary hematology*. 3.ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1975. p. 807.
- TAYLOR, B.C.; STOTT, J.L.; THURMOND, M. A., PICANSO, J. P. Alterations in lymphocyte subpopulations in bovine leukosis virus-infected cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 31, p. 35-47, 1992.
- TAYLOR, J.A. & JACOBS, R. M. Effects of plasma and serum on the in vitro expression of bovine leukemia virus. *Lab. Invest.*, v.69, p. 340-346, 1993.
- WILLIAMS, D.L.; ANBORSKI, G.F.; DAVIS, W. C. Enumerations of T and B lymphocytes in bovines leukemia virus-infected cattle, using monoclonal antibodies. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, p. 1098-1103, 1988.

Recebido para publicação em 6/9/99