



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

NORMA HELLEN RODRIGUES LUSTOSA

**DETECÇÃO DO DNA DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB) EM AMOSTRAS
DE TECIDO PULMONAR HUMANO**

Recife
2020

NORMA HELLEN RODRIGUES LUSTOSA

**DETECÇÃO DO DNA DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB) EM AMOSTRAS
DE TECIDO PULMONAR HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas

Coorientador: Dr. André Luiz Santos de Jesus

Recife
2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Lustosa, Norma Hellen Rodrigues

Detecção do DNA do vírus da leucose bovina (VLB) em amostras de tecido pulmonar humano / Norma Hellen Rodrigues Lustosa. – 2020.

59 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas.

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Santos de Jesus.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2019. Inclui referências.

1. Pulmões – Câncer. 2. Câncer – Aspectos genéticos. 3. Bovinos – Doenças. I. Freitas, Antônio Carlos de (orientador) II. Jesus, André Luiz Santos de (coorientador) III. Título.

616.994

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020 - 149

NORMA HELLEN RODRIGUES LUSTOSA

**DETECÇÃO DO DNA DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB) EM AMOSTRAS
DE TECIDO PULMONAR HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovada em: 13/02/2020

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Antônio Carlos de Freitas (Orientador)

Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado tanta força em meios as dificuldades que passei, em uma cidade nova, longe da minha família, dos meus pais, me vendo muitas vezes sozinha, porém agradecendo sempre pelo dom da fortaleza.

Agradeço especialmente ao meu orientador, professor Dr. Antônio Carlos de Freitas por ter me dado a oportunidade de ser sua orientanda e por repassar seus conhecimentos com tanta dedicação. Ao meu coorientador Dr. André Luiz Santos de Jesus por estar sempre disponível e me ajudar em todos os detalhes desse trabalho, sempre paciente.

Aos meus pais, por sempre apoiarem minhas decisões, inclusive a de viajar para tão longe em busca de um dos meus sonhos, por estarem sempre presentes e dispostos a todo sacrifício em prol da minha felicidade e, também a minha família que, sempre unida, me ajudou em tudo que necessitei.

Aos meus amigos com quem dividi apartamento, Ana Paula, Alanne Raissa, Herbert, Denise, Karyanna, Jessica de Oliveira, Jessica Melo e Marianny. Obrigada pelos momentos que passamos juntos, dividimos alegrias e tristezas, passamos mais tempo juntos do que com nossas próprias famílias, fato que nos deixou mais maduros e nos fez mais fortes. Que Deus abençoe nossos caminhos.

A todos os meus colegas do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental – LEMTE, pela amizade, por sempre estarem dispostos a ajudar, compartilhar seus conhecimentos e por todo o apoio que me deram nesses três anos de LEMTE.

CAPES e ao CNPq que forneceram os subsídios financeiros para que este projeto pudesse ser concretizado.

*“Todo cientista é um espião dos
mistérios de Deus.”*

Josué Montello, 1917.

RESUMO

O câncer de pulmão é a neoplasia multifatorial mais recorrente em todo o mundo, com mais de 2 milhões de novos casos registrados (2018). Agentes infecciosos, como os vírus, são amplamente estudados como possíveis fatores de risco para esta doença. Dentre eles, está o vírus da leucose bovina (VLB), que vem sendo identificado em alguns órgãos humanos, inclusive o pulmão. O VLB é um retrovírus que possui tropismo por linfócitos B, sendo o agente causador da Leucose Bovina Enzootica (LBE), doença muito comum em bovinos. Este vírus está presente em carne bovina e em laticínios comercializados e, nos últimos anos, algumas pesquisas vêm investigando a presença do VLB em alguns tecidos humanos e em algumas neoplasias, como o câncer de mama e de pulmão. E, mesmo com 15% dos cânceres humanos sendo relacionados a microrganismos, para o câncer de pulmão, não há uma comprovação de que os vírus, por exemplo, tenham papel causal nesta neoplasia. Com isso, este estudo teve como objetivo investigar a presença do DNA do VLB em amostras pulmonares do Nordeste do Brasil. Por meio da nested PCR, utilizando os primers Tax e Gag, foram analisadas 75 amostras de biopsias de pulmão, neoplásicas e não neoplásicas, com detecção de material proviral do VLB em 6,67%. Estes resultados demonstram que o VLB está presente em tecidos pulmonares, abrindo espaço para que mais estudos sejam feitos sobre uma provável contribuição do VLB, seja de forma direta ou indireta, na carcinogênese pulmonar.

Palavras-chave: Câncer de Pulmão. Vírus da Leucose Bovina. Nested PCR.

ABSTRACT

Lung cancer is the recurrent multifactorial neoplasm worldwide, with more than 2 million new cases registered (2018). Infectious agents, such as viruses, are widely studied as possible risk factors for this disease. Among them is the bovine leukosis virus (VLB), which has been identified in some human organs, including the lung. VLB is a retrovirus that has tropism by B-lymphocytes, being the causative agent of Enzootica Bovine Leucosis (LBE), a disease very common in cattle. This virus is present in beef and dairy products marketed and, in recent years, some research has investigated the presence of VLB in some human tissues and in some neoplasms, such as breast and lung cancer. However, even with 15% of human cancers being related to microorganisms, for lung cancer, there is no evidence that viruses, for example, have a causal role in this neoplasm. Therefore, this study aimed to investigate the presence of VLB DNA in pulmonary samples from northeastern Brazil. Through nested PCR, using the Primers Tax and Gag, 75 samples of lung, neoplastic and non-neoplastic biopsies were analyzed, detection of VLB proviral material in 6.67%. These results demonstrate that VLB is present in pulmonary tissues, making room for further studies to be made on a probable contribution of VLB, either directly or indirectly, in pulmonary carcinogenesis.

Key words: Lung cancer. Bovine Leukemia Virus. Nested PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1-	Classificação da OMS para 2015 de carcinomas de células não pequenas.....	17
Figura 1-	Esquematização da estrutura do VLB.....	23
Figura 2-	Estrutura do provírus do VLB.....	27
Figura 3-	Fases da Indução da leucomogênese induzida pelo VLB..	34
Quadro 2-	Especificações dos <i>Primers</i> utilizados.....	41
Figura 4-	Detecção do DNA do VLB em amostras de tecido pulmonar com o uso do primer <i>Tax</i>	44
Figura 5-	Detecção do DNA do VLB em amostras de tecido pulmonar com o uso do primer <i>Gag</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Dados gerais das biópsias.....	43
Tabela 2-	Dados e diagnósticos histológicos das amostras positivas para o VLB.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADC	Adenocarcinoma
CA	Capsídeo
CCE	Carcinoma de células escamosas
CCG	Carcinoma de células grandes
CCP	Carcinoma de células pequenas
CNECG	Carcinoma neuroendócrino de células grandes
CPCNP	Câncer de pulmão de células não pequenas
CPPC	Câncer de pulmão de pequenas células
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Vírus Epstein-Barr
FPPS	Farnesil pirofosfato sintetase
HDAC	Histonas desacetilases
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
HTLV-1	Vírus linfotrópico de células T humano tipo 1
IN	Integrase
LBE	Leucose bovina enzootica
LP	Linfocitose persistente
MA	Proteína matriz
Me	Média aritmética
NC	Núcleocapsídeo
pb	Pares de base

PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PCR	Reação em cadeia polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SU	Proteína de superfície
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
VLB	Vírus da leucose bovina
VLM	Vírus da leucemia murina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 CÂNCER DE PULMÃO	16
2.1.1 Classificação histológica.....	16
2.1.2 Fatores de risco.....	18
2.2 HISTÓRICO- VLB.....	20
2.3 VLB- CARACTERÍSTICAS GERAIS	20
2.4 ESTRUTURA RETROVIRAL E GENOMA	22
2.4.1 Promotor LTR	24
2.4.2 Os genes gag e protease	25
2.4.3 Gene <i>pol</i>	26
2.4.4 Gene <i>env</i>	26
2.4.6 Rex.....	28
2.4.7 Tax	28
2.5 INFECÇÃO E PATOGÊNESE NO HOSPEDEIRO NATURAL	30
2.6 TRANSMISSÃO	31
2.7 PREVALÊNCIA	32
2.8 PROCESSO CARCINOGENICO.....	33
2.9 VLB E O CÂNCER DE PULMÃO	35
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 AMOSTRAS ANALISADAS	38
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	38
4.3 EXTRAÇÃO DO DNA.....	39
4.4 DETECÇÃO DO VLB	39
5 RESULTADOS.....	41
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BIÓPSIAS ANALISADAS	41
5.2 DETECÇÃO DO DNA DO VLB NAS AMOSTRAS DE PULMÃO	44
5.3 ANÁLISE DIAGNÓSTICA DAS AMOSTRAS POSITIVAS	45

6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão é a neoplasia mais recorrente em todo o mundo com mais de 2 milhões de novos casos registrados em 2018, atingindo tanto homens quanto mulheres. Aqui no Brasil, essa neoplasia é a mais comum em homens e mulheres (descartando o câncer de pele não melanoma) sendo responsável por quase 32 mil mortes em 2018 com mais de 34 mil novos casos registrados (GLOBOCAN, 2020).

Existem vários fatores de risco associados ao câncer de pulmão, dentre eles estão o tabaco, alimentação, fatores genéticos (histórico familiar) e processos inflamatórios provocados por infecções diversas (Smith-Warner et al., 2002; Sarid and Gao 2011; Carreras-Torres et al., 2017). Porém, mesmo havendo vários estudos que associem agentes infecciosos ao câncer de pulmão, eles ainda não são considerados fatores de risco de fato (Klein et al., 2009; Sarid and Gao 2011; Kim et al., 2018)

Alguns vírus foram encontrados em tumores pulmonares e, recentemente, o Vírus da Leucose Bovina (VLB) vem se mostrando como uma possível infecção zoonótica sendo que, nos últimos 5 anos, têm se acumulado evidências de que este vírus tem a capacidade de infectar humanos, sendo identificado em tecido mamário, sangue e, também, em tecido pulmonar, além de já ter sido relatado a presença de anticorpos contra o VLB nos soros humanos (Buehring et al., 2014; Gillet et al., 2007; Buehring et al., 2014; Buehring et al., 2015; Robinson et al., 2016; Buehring et al., 2017; Buehring et al., 2019).

O VLB é um Deltaretrovírus pertencente à família *Retroviridae* que infecta linfócitos B, sendo o responsável pela Leucose Bovina Enzootica (LBE), doença muito comum em bovinos (Sagata et al., 1985). Ele infecta naturalmente espécies ruminantes, sendo capaz de infectar experimentalmente outros animais como ratos, coelhos, galinhas e porcos (Lee et al., 2012).

Os estudos que ligam o VLB ao câncer de pulmão ainda são controversos e escassos, havendo, até então, apenas dois trabalhos de resultados conflitantes entre si (Lee et al., 2005; Robinson et al., 2016). Estes resultados abrem espaço para mais estudos que reforcem ou não um possível papel do VLB na carcinogênese do pulmão. Portanto, tendo em vista um cenário em que há evidências da possível infectividade e oncogenicidade do VLB em alguns tecidos humanos, e a escassez de estudos

direcionados ao câncer de pulmão, este trabalho irá contribuir com mais dados para a literatura, além de abrir espaço para pesquisas mais aprofundadas sobre o assunto.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE PULMÃO

O câncer de pulmão é a neoplasia mais recorrente em todo o mundo desde 1985. De acordo com a última estimativa mundial (2018), 2 milhões de novos casos foram registrados, com incidência de 1,36 milhões em homens e 725 mil em mulheres. Aqui no Brasil, essa neoplasia é a mais comum em homens e mulheres (descartando o câncer de pele não melanoma) sendo responsável por mais de 32 mil mortes em 2018. A última estimativa (2018) foi de mais de 31 mil novos casos e quase 34 mil mortes (GLOBOCAN, 2020).

2.1.1 Classificação histológica

Em 2015, a OMS e a IASLC atualizaram suas diretrizes com o objetivo de fornecer terminologia diagnóstica e gerenciamento clínico apropriado para o paciente. Algumas atualizações das novas diretrizes incluem: a reclassificação do "carcinoma bronquioloalveolar" em vários subtipos diferentes, incluindo adenocarcinoma *in situ*, ADC minimamente invasivo e ADC com padrão de crescimento lepidico, o agrupamento de tumores neuroendócrinos em uma categoria e a alteração no diagnóstico para vários tumores, incluindo "hamartoma" para "hamartoma pulmonar". A classificação dos tumores de pulmão após as mudanças citadas está resumida no quadro 1 (Travis et al., 2015).

A mudança se fez após a constatação que mutações no receptor de fator de crescimento epidérmico (do inglês epidermal growth factor receptor- EGFR) e rearranjos anaplastic lymphoma kinase (ALK) são observados, quase que exclusivamente, em adenocarcinomas de pulmão e, quando identificadas, essas anormalidades moleculares se tornam essenciais para a clínica do paciente (Maemondo et al., 2010).

Quadro 1- Classificação da OMS para 2015 de Carcinomas de Células Não Pequenas

TIPOS HISTOLÓGICOS	SUBTIPOS HISTOLÓGICOS
TUMORES EPITELIAIS	
Lesões pré- invasivas	• Hiperplasia adenomatosa atípica • Adenocarcinoma <i>in situ</i> - Não mucinoso - Mucinoso - Misto (mucinoso e não mucinoso)
Adenocarcinoma minimamente invasivo	• Não mucinoso • Mucinoso • Misto
Adenocarcinoma invasivo	• Adenocarcinoma lepidico • Adenocarcinoma acinar • Adenocarcinoma papilar • Adenocarcinoma micropapilar • Adenocarcinoma sólido
Variantes do adenocarcinoma invasivo	• Adenocarcinoma mucinoso invasivo • Adenocarcinoma colóide • Adenocarcinoma fetal (baixo e alto grau) • Adenocarcinoma entérico • Cistoadenocarcinoma mucinoso
Carcinoma de células escamosas	<i>Lesão pré-invasiva</i> • Carcinoma de células escamosas <i>in situ</i> Carcinoma espinocelular de queratinização • Carcinoma espinocelular não-queratinizante • Carcinoma espinocelular basalóide

Tumores neuroendócrinos	• Carcinoma de pequenas células • Carcinoma combinado de pequenas células • Carcinoma neuroendócrino de grandes células • Carcinoma neuroendócrino combinado de células grandes
-------------------------	--

Adaptado (Travis, 2015).

2.1.2 Fatores de risco

O câncer de pulmão é uma neoplasia multifatorial, nas quais, podem ser divididas, de forma geral, em três fatores principais: estilo de vida, fatores genéticos e fatores ambientais.

Em relação ao estilo de vida, destaca-se principalmente o uso do tabaco. Com seu efeito carcinógeno sendo reconhecido desde a década de 1960 pelas autoridades reguladoras e de saúde pública, o tabagismo é considerado, desde então, a principal causa de quase todos os principais tipos histológicos de câncer de pulmão (Malhotra et al., 2016). Além disso, o tempo de tabagismo é um fator considerado determinante para o risco de câncer de pulmão em fumantes. Neste caso, o risco de fumantes contínuos é de 20 a 50 vezes maior se comparado aos não fumantes (Doll et al., 2004).

No caso de ex- fumantes, o risco relativo de desenvolvimento de câncer de pulmão diminui, mesmo após um longo tempo de uso do tabaco o efeito da parada é aparente (Malhotra et al., 2016). E, existem ainda, os fumantes passivos (second-hand smoke) que são expostos a fumaça do cigarro, e devido a convivência com fumantes, inalam mais de 8 mil compostos presentes na fumaça, sendo que pelo menos 70 destes são conhecidos ou prováveis agentes cancerígenos em humanos (Hecht e Szabo, 2014; IARC- International Agency for Research on Cancer, 2020)

Outro ponto relacionado ao estilo de vida é a alimentação que também pode influenciar surgimento desse tipo de câncer, como o alto consumo de carne vermelha,

por exemplo. Estudos demonstraram que durante o processo de fritura ou cozimento da carne vermelha, ocorre a produção de nitrosaminas, compostos potencialmente carcinogênicos resultantes da reação entre aminas secundárias e agentes nitrosantes (Sinha et al., 2000; Smith-Warner et al., 2002). Em relação ao consumo de álcool, não há um consenso sobre seus possíveis efeitos no câncer de pulmão, mesmo sendo mostrado seus efeitos em outros tipos de cânceres, como os de mama, câncer de cabeça e pescoço, colon, reto e carcinoma espinocelular do esôfago (Bagnardi et al., 2015).

Fatores ambientais, que deixam o paciente susceptível a alterações respiratórias (bronquite e enfisema), frequentemente podem levar a um quadro de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). A DPOC é caracterizada por sintomas respiratórios persistentes e resposta inflamatória aprimorada, geralmente devido a partículas e gases (GOLD, 2018). Estudos mostraram que pacientes com DPOC têm risco aumentado de desenvolvimento de câncer de pulmão, independentemente de serem fumantes (Young et al., 2008; Adcock et al. 2011; Gonzalez et al., 2016). Como os pacientes com tuberculose pulmonar, por exemplo, que também têm o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão aumentado. Um estudo mostrou que a tuberculose pulmonar prévia pode estar associada a mutações mais frequentes do EGFR e pior resposta ao tratamento de EGFR-TKIs em pacientes com adenocarcinoma pulmonar (Hwang et al., 2019).

A poluição do ar por partículas finas, não só em ambientes fechados (Kurmi et al., 2012), como também dos ambientes urbanos, se mostra um fator importante para a propensão ao câncer de pulmão (Loomis et al., 2014; Moore et al., 2017). E, há também, vários outros fatores de risco relacionados a exposição a alguns agentes, tais como: radiações ionizantes, exposições ocupacionais relacionadas a exposição a amianto, sílica, radônio, metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Cogliano et al., 2011; Malhotra et al., 2016).

Quanto ao risco genético, há alguns pontos importantes como o histórico familiar e genes de alta penetração e polimorfismos genéticos. Alguns estudos de associação genômica- GWAS (do inglês Genome-wide Association Studies) identificaram o locus do cromossomo 15q25.1 como uma região de suscetibilidade ao câncer de pulmão (Hung et al., 2008; Thorgeirsson et al., 2008; Amos et al., 2008; Byun et al., 2018; Ji et al., 2018). Outros estudos mostraram alguns genes raros e altamente penetrantes de suscetibilidade ao câncer de pulmão localizados nas regiões

6q23-25, 18p11.23, 2p22.2 , 14q13.1, 16p13 e 20q13.11 (Bailey-Wilson et al., 2004; Amos et al., 2010; Musolf et al., 2016; Musolf et al., 2017; McKay et al., 2017).

2.2 HISTÓRICO- VLB

Uma série de relatos que descrevia um conjunto de sinais clínicos ligados a Leucose Enzoótica Bovina (LEB) já era descrita no século XIX. Análises feitas por Leisering sobre nódulos amarelados no baço aumentado de uma vaca haviam sido comunicadas na literatura alemã em 1871 (Leisering, 1871 citado por Olson and Miller, 1987).

Alguns anos depois, Bollinger descreveu a leucose bovina como uma entidade de forma clínica bem definida, sendo que, em 1876, os primeiros casos de malignidade linfocítica bovina foram relatados por Siedamgrotzky e Hofmeister (Bollinger, 1874; Siedamgrotzky and Hofmeister, 1876 citado por Olson and Miller, 1987). Desta forma, a Europa, mais especificamente Prússia Oriental e atual Lituânia, pode ser considerada o berço da LBE (Schöttler and Schöttler, 1934 citado por Johnson and Kaneene, 1992).

A introdução de raças bovinas europeias em países livres da doença provocou a sua possível disseminação e difusão generalizada. E, mesmo diante de todas essas evidências, a caracterização e descoberta do agente infeccioso da LEB só foi registrada muitas décadas depois, tendo como base dados epidemiológicos. Apenas em 1968 o agente causador desta malignidade foi isolado por meio de cultura e sendo então intitulado Vírus da Leucose Bovina (do inglês Bovine Leukemia Virus, BLV) (Bendixen, 1965; Miller et al., 1969).

2.3 VLB- CARACTERÍSTICAS GERAIS

O Vírus da Leucose Bovina (VLB) é um *Deltaretrovírus* pertencente à família *Retroviridae*, Subfamília *Orthoretrovirinae*, que possui tropismo por linfócitos B, sendo o agente causador da Leucose Bovina Enzoótica, doença muito comum em bovinos

(Aida *et al.*, 2013). Os bovinos domésticos (*Bos taurus*) e os búfalos-d'água (*Bubalus bubalis*) são os hospedeiros naturais do VLB, porém, este vírus também é capaz de infectar outros ruminantes (Gillet *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012). Além disso, já foi experimentalmente mostrado que o VLB é capaz de infectar outras linhagens celulares em cultura de células de monocamada, dentre elas a WI-38 que é uma linhagem celular humana, diploide, composta por fibroblastos derivados de tecido pulmonar fetal (Graves and Ferrer, 1976; Martinez Cuesta *et al.*, 2018) e, também, infectar outros animais como coelhos, ratos, galinhas e porcos (Gillet *et al.*, 2007).

O VLB apresenta semelhança estrutural com outro *Deltaretrovírus*, o vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1, do inglês Human T-cell Leukemia Virus type 1), que também é um retrovírus oncogênico associado a leucemia de células T em humanos (Aida *et al.*, 2013; Martinez Cuesta *et al.*, 2018). Apesar da sequência de seus genomas serem diferentes, eles compartilham da mesma região pX, situada entre o gene *env* e o 3' LTR. Consequentemente, ambos expressam as proteínas reguladoras *tax* e *rex* que são codificadas pela região pX. Além disso, foi demonstrado que ambos podem imortalizar fibroblastos primários *in vitro* (Aida *et al.*, 2013; Lairmore, 2014).

O aumento e ruptura do baço que leva, consequentemente, a uma hemorragia letal no gado, são as manifestações clínicas marcantes da leucemia provocada pelo VLB (Gillet *et al.*, 2007). As células B transformadas podem induzir o aumento dos linfonodos e provocar linfoma. Além disso, essa proliferação local de células B, chamada de Linfossarcoma ou linfoma extranodal, pode provocar um agravo por infiltrar diversos tecidos como coração, olhos, pele, fígado, baço e pulmão. Os defeitos funcionais por comprometimento de órgãos tão essenciais, por consequência do desenvolvimento desses tumores, geralmente são incompatíveis com a vida (Gillet *et al.*, 2007).

O aumento do número de linfócitos B no sangue periférico, denominada de linfocitose persistente (LP), é outra manifestação clínica associada ao VLB. O estágio de LP, considerado a forma benigna da leucemia, afeta cerca de um terço do gado infectado. O número de células B no sangue periférico, nesse estágio, geralmente se mantém estável por um longo período, sem provocar outras manifestações clínicas (Gillet *et al.*, 2007).

Sua principal forma de transmissão é a horizontal, por exposição direta ao fluido biológico contaminado com linfócitos infectados, principalmente sangue, mas também

saliva, sêmen, leite e picada de insetos (Ogawa *et al.*, 1987; Ooshiro *et al.*, 2013). Além disso, há a transmissão iatrogênica, que ocorre por meio, principalmente, de agulhas infectadas, e também por meio de outros procedimentos como descorna e tatuagem de orelha, que contribuem de forma significativa para a disseminação viral (Ruiz *et al.*, 2018).

2.4 ESTRUTURA RETROVIRAL E GENOMA

A denominação retrovírus se fez devido a sua capacidade de transcrever um intermediário de DNA através do genoma de RNA por meio da proteína transcriptase reversa (TR). Os vírions retrovirais geralmente são compostos por duas cópias de sentido positivo, o genoma dentro de um núcleo composto de proteínas virais, circundado por um envelope que possui a mesma composição da membrana celular (Freed, 2004).

O genoma proviral do VLB é composto por cerca de 8,4 kbp, flanqueado pela região promotora LTR (GenBank, 2020). Estruturalmente, todos os retrovírus expressam os genes do grupo estrutural (Gag), polimerase (Pol) e envelope (Env), e ainda podem ser classificados como simples ou complexos, de acordo com os genes adicionais que possam apresentar (Milone e O'Doherty, 2018). O vírus da leucemia murina (VLM), por exemplo, é classificado como simples por conter apenas os três genes estruturais (Mattei *et al.*, 2016). Em contraste, podemos citar os lentivírus, como o VLB, que são classificados como vírus complexos por conterem genes acessórios e regulatórios adicionais (Milone e O'Doherty, 2018).

Os genes estruturais do VLB produzem as proteínas responsáveis pela composição física do vírus (figura 1). A partir dos transcritos de Gag originam-se três proteínas: nucleocapsídeo, capsídeo e matriz. O gene env é responsável pela produção das proteínas de superfície e transmembrana, gp51 e gp30 respectivamente, que trabalham de forma conjunta no processo de ligação e fusão dos receptores de membrana celular durante a entrada do vírus (Gillet *et al.*, 2007; Lairmore, 2014).

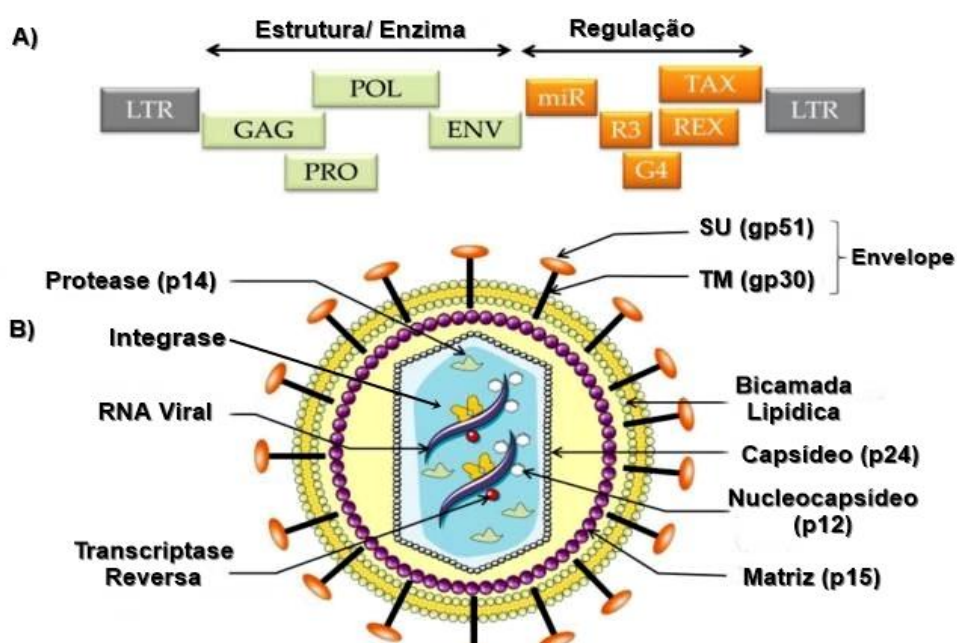


Figura 1: Esquematização da estrutura do VLB: (A) genoma do Vírus da Leucose Bovina, com os genes estruturais em verde-claro e os genes regulatórios da região pX destacados em laranja. Abaixo (B) está a representação da partícula viral composta por duas cópias de RNA fita simples, associados as proteínas do nucleocapsídeo (p12), transcriptase reversa e integrase, dentro de um capsídeo formado pelas proteínas p24. A proteína p15 (matriz) é a responsável por interligar o capsídeo e o envelope externo, que é formado por uma bicamada lipídica, no qual, as demais proteínas virais (gp51 e gp30) ficam inseridas. (Adaptado de Barez et al. 2015).

No caso do VLB, além dos genes estruturais padrão, seu genoma possui uma região pX (figura 1) (Barez et al., 2015), como também é observado em outros Deltaretrovírus. Esta região está localizada entre o envelope e a repetição terminal longa 3' (do inglês long terminal repeat- LTR) (Polat et al., 2017), e é responsável pela expressão dos genes acessórios, que são transcritos e produzidos por splicing alternativo, como Tax, Rex e as proteínas R3 e G4. Tax e Rex agem a nível transcricional e pós-transcricional, agindo no processo de modulação da expressão gênica viral e celular. As demais proteínas não estruturais, R3 e G4, agem na indução da replicação e patogênese *in vivo* (Barez et al., 2015).

2.4.1 Promotor LTR

Nesta região há um elemento regulador chave chamado TxRE (Tax-responsive element), principal determinante na regulação da expressão do VLB, também conhecido por TAR, que é uma cópia triplicada de uma sequência de 21pb que possui, no centro de sua sequência, um elemento que responde ao AMP cíclico (CRE) quase perfeitamente conservado. E são necessários apenas dois destes TxREs para patogenicidade e infectividade em ovinos (Pluta et al., 2018).

O regulador TxRE também interage com os fatores de transcrição CREB, ATF-1 e ATF-2 e a quantidade de complexo proteína-DNA se correlaciona com o nível de expressão viral (Pluta et al., 2018). Os fatores de transcrição CREB/ATF, quando ativados, regulam a transcrição promovida por LTR. Além disso, TxRE também é um alvo da proteína Tax, que é um ativador da transcrição viral e aumenta a ligação do CREB ao DNA (Pluta et al., 2018).

Modificações epigenéticas a nível de transcrição, como metilação do DNA ou acetilação das moléculas de histona, regulam o processo de transcrição. Animais infectados com VLB, no qual foi feito um tratamento com inibidores de histonas desacetilases (HDAC) no cultivo de suas células mononucleares de sangue periférico (PBMCs), demonstrou um aumento significativo na sua expressão viral (Nguyen *et al.*, 2004). Estes inibidores aumentam de modo coordenado a transativação de LTR por Tax de forma dependente de CRE, mostrando que há uma correlação íntima entre o nível de acetilação de histonas e a ativação transcricional de LTR (Tajima et al., 2003; Pluta et al., 2018).

Assim como a acetilação, a metilação é outro modo de regular a transcrição de LTR. Um ensaio repórter de luciferase mostrou que a metilação *in vitro* de LTR, em uma cultura de células B derivada de linfoma L267, utilizando a Sss1 metiltransferase, reduz a atividade deste promotor (Pierard et al., 2010).

2.4.2 Os genes gag e protease

O gene *gag* é responsável por codificar o precursor Pr44^{gag}. A partir dele, são formadas, por meio de clivagens, as proteínas p15, p24 e p12, que são as proteínas não glicosiladas da partícula viral (Polat et al., 2017).

A proteína p15, proteína da matriz (MA), possui 109 aa e corresponde a porção NH₂ do precursor de *gag* que sofre miristoilação e fosforilação. A proteína MA interage com a bicamada lipídica viral, além de também interagir com o RNA viral genômico. Sua estrutura contém quatro hélices unidas por grampos curtos. Essa proteína ainda pode sofrer proteólise e pode ser processada em mais três fragmentos: p10, p4 e em um produto de sete aminoácidos. O produto p10, que também sofre miristoilação, é o resultado da clivagem N-terminal da MA (Gillet et al., 2007).

A proteína p12, chamada de nucleocapsídeo (NC), possui 69 aa e é rica em prolina, deixando-a ligada fortemente ao RNA genômico que está empacotado. A principal constituinte do capsídeo é a p24 (CA). Esta proteína se apresenta moderadamente hidrofóbica e de carga neutra. Além disso, se apresenta como um alvo importante no processo de resposta imune, por induzir altos títulos de anticorpos no soro de animais infectados, sendo que, duas de suas regiões são reconhecidas por linfócitos T específicos (Gillet et al., 2007).

Com base em um anticorpo monoclonal, específico para a p24 do VLB, descobriu-se que há uma reatividade cruzada entre os antígenos do capsídeo do VLB e do HTLV-1, ou seja, há um epítipo comum entre esses dois vírus, o que sugere uma relação evolutiva entre ambos (Gillet et al., 2007).

As modificações pós-transcricionais que ocorrem no precursor Pr44^{gag} e originam as proteínas MA, CA e NC, são realizadas pela protease viral p14. Esta proteína é codificada em uma região localizada entre os genes *gag* e *pol* e é sintetizada a partir de outro precursor de *gag*, o pr66^{gag-prt}. A p14 pertence ao grupo das aspartil-proteinases e pode ser inibida pela pepstatina A (potente inibidor de proteases aspárticas) (Gillet et al., 2007).

2.4.3 Gene *pol*

Este gene é o responsável por codificar a proteína transcriptase reversa (TR), uma DNA polimerase dependente de RNA que utiliza preferencialmente o Mg^{2+} ao Mn^{2+} em suas atividades, como também nas de RNase H (Avidan et al., 2002). A síntese de DNA realizada pela TR inicia-se com a ligação do primer localizado 2pb a jusante de U5. Após a transcrição reversa, duas moléculas de DNA circular, fechados de forma covalente, são produzidas, abrigando uma ou duas cópias de LTR. O provírus (DNA de cadeia dupla), então, é direcionado pela integrase (IN) para sua integração ao genoma. A sequência reconhecida pela IN, no processo de rearranjo do DNA, está localizada na extremidade 3' da região U5 LTR. A partir do momento que o provírus se integra, em locais aleatórios, ao genoma do hospedeiro, o provírus é flanqueado por repetições diretas de DNA celular (Tanaka and Komuro, 2005; Gillet et al., 2007).

2.4.4 Gene *env*

O gene *env*, que codifica o precursor $pr72^{env}$, é transcrito em um mRNA de 5,1kb (Lairmore, 2014). Este precursor é clivado por convertases do tipo subtilisina/kesina, como furina, dando origem a duas subunidades (Gillet et al., 2007). Os produtos resultantes são os polipeptídeos glicosilados gp51 (SU) e gp30 (TM), que são proteínas transmembranas que se associam, através de pontes dissulfeto, tornando-se um complexo relativamente estável (Polat et al., 2017).

A SU extracelular se mostra extremamente imunogênica induzindo a expressão acentuada de anticorpos específicos em animais infectados, que é uma característica útil na produção de vacinas, o que não é apresentado pela TM (Juliarena et al., 2017; Martinez et al., 2018). Já a proteína TM demonstra ser um fator chave durante o processo de transmissão viral célula-célula, que ocorre com a fusão de uma célula infectada contendo as proteínas do envelope em sua superfície e um novo linfócito-alvo. Acredita-se que durante esse processo, ela utiliza um peptídeo de fusão que é

capaz de deixar a membrana celular instável por meio de sua inserção oblíqua na bicamada lipídica (Gillet et al., 2007)

2.4.5 Região *pX*: R3 e G4

As ORFs (do inglês Open Reading Frame) R3 e G4 estão localizadas em uma região interposta entre os genes *tax/rex* e o envelope (figura 2) (Gillet et al., 2007). O mRNA de G4 apresenta apenas um íntron que está localizado entre um sítio doador de splicing incomum na posição 502 e um receptor na extremidade 5' de G4. O R3 é bicistrônico, ou seja, seus dois primeiros éxons são comuns ao mensageiro *tax/rex*

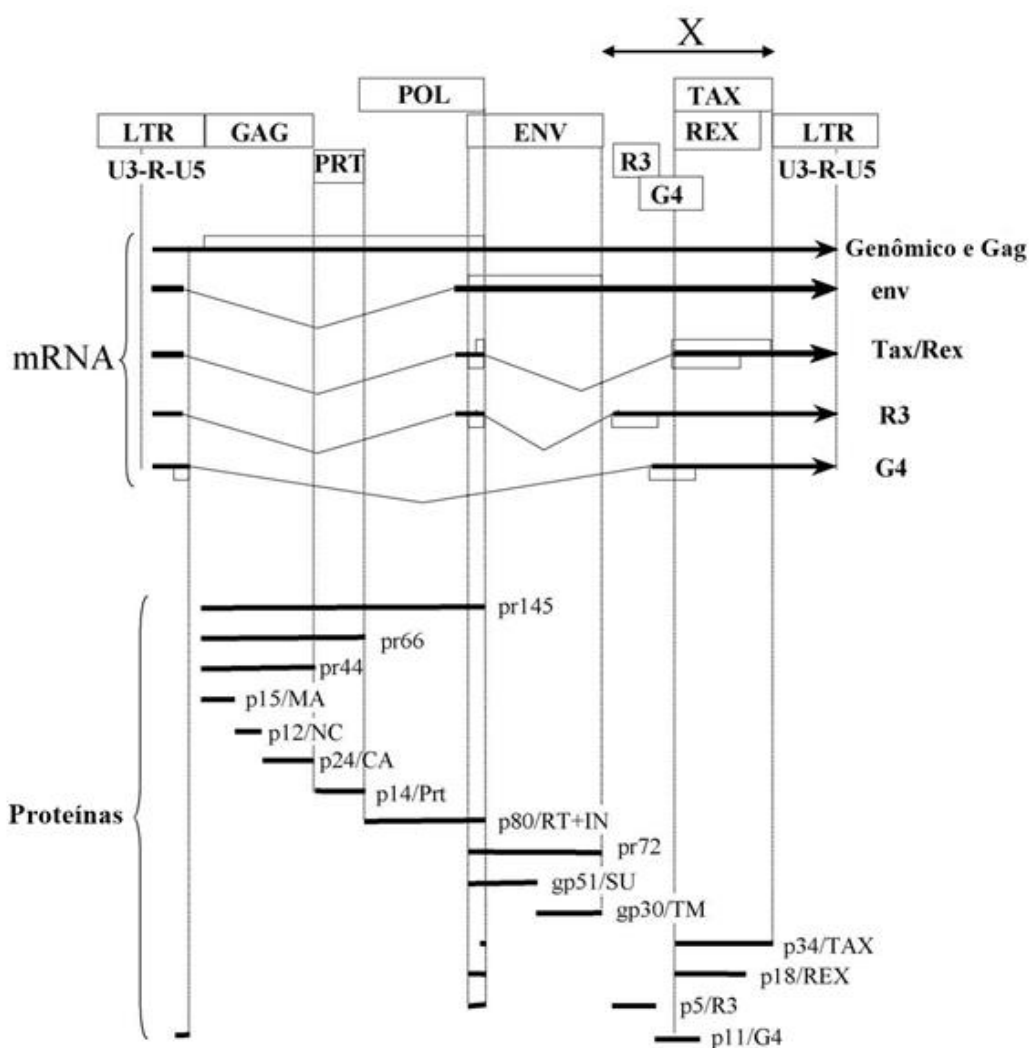


Figura 2: Estrutura do provírus do VLB: genes, transcritos de RNA e proteínas virais. (Adaptado de Gillet et al., 2007)

porém, o segundo íntron é menor fazendo com que o splicing ocorra no meio da ORF R3 (Polat et al., 2017).

É provável que G4 desempenhe uma função no processo de transformação celular devido ao fato de sua expressão ectópica induzir a imortalização de fibroblastos primários em embriões de ratos (Lefèbvre et al., 2002). G4 também interage com a proteína FPPS (farnesil pirofosfato sintetase) que está envolvida na síntese de FPP, substrato necessário para a síntese de RAS (Florins et al., 2007).

Possivelmente, R3 e G4 são dispensáveis na infectividade *in vivo*, porém a integridade desses genes se mostra essencial para que haja a propagação eficiente dentro do hospedeiro (Polat et al., 2017).

2.4.6 Rex

A codificação do mRNA de Rex é o resultado da excisão de dois íntrons, um localizado entre o sítio de splicing do nucleotídeo 305 (Florins et al., 2007). O interessante é que este mecanismo de processamento duplo origina uma molécula de 2,1 kb que codifica não só Rex, como também a proteína Tax (Gillet et al., 2007).

A proteína Rex, de 18 kDa, está associada aos poros nucleares e possui um sinal de ancoragem nuclear. Além disso, a Rex é rica em motivos arginina-amino terminais necessários para a ligação ao RNA e localização nuclear, e também, possui um domínio de ativação rico em leucina (Gillet et al., 2007).

2.4.7 Tax

A proteína Tax, uma ativadora transcricional da expressão viral, também é codificada pelo mRNA de 2,1 kb a partir do splicing alternativo da região *pX* (Gillet et al., 2007). O início de sua tradução ocorre no primeiro resíduo de metionina que fica localizado a montante do códon de parada *pol*. A ORF de Tax localiza-se entre o gene *env* e a região LTR 3', sendo o maior da região *pX* (Aida et al., 2013).

Sua localização principal é o núcleo, mas também pode ser encontrada no citosol em quantidades significativas. A proteína é rica em resíduos de prolina e leucina e possui uma meia vida de aproximadamente 5 a 6 horas. A *Tax* sofre modificações pós-traducionais de fosforilação em dois resíduos de serina e, apesar de seu peso molecular seja de 34 kDa, esta proteína pode migrar como um produto de 34-38 kDa, possivelmente devido a fosforilação (Gillet et al., 2007).

A principal função de *tax*, e a primeira a ser identificada, é a ativação da transcrição viral (Willems et al., 1987; Sakurai et al., 1991). Para que essa ativação ocorra, é necessário que *Tax* interaja com fatores de transcrição do hospedeiro, como CREB, que agem ligando-se aos elementos potenciadores de 21 pb localizados na 5' LTR (Arainga et al., 2012).

Outra função interessante exercida por *Tax* é a sua capacidade de induzir a imortalização de fibroblastos primários de embrião de rato (REF). Além disso, *Tax* também age em cooperação com o oncogene Ha-ras induzindo a transformação completa de células formadora de tumores, quando injetada em camundongos (Arainga et al., 2012). De fato, *Tax* não é exatamente um oncogene pois não possui uma correlação celular, mas comporta-se de forma semelhante a proteína Myc (oncogene Myc) (Tajima and Aida, 2000).

Pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais *Tax* induz a transformação celular. Um estudo sobre a expressão de *Tax* em linfócitos B primários de ovinos mostraram que essa proteína impacta na proliferação e sobrevivência celular, levando ao crescimento independente de citocinas (CD154 e interleucina-4) (Klener et al., 2006). Além disto, *Tax* age a nível de reparo de DNA, inibindo o processo de excisão de base por dano oxidativo, aumentando consideravelmente a quantidade de mutações ambientais no DNA celular (Twizere et al., 2005).

Além dos genes descritos até então, o genoma do VLB também possui microRNAs (miRNAs) virais que são codificados pela RNA-polimerase III localizados entre as regiões do *env* e *pX*. Esses miRNAs são extremamente expressos em células pré-leucemicas e malignas, que por meio dos seus efeitos sobre a carga proviral e, conseqüentemente, na replicação viral no hospedeiro, podem exercer papéis tanto no início quanto na progressão do tumor (Kincaid et al., 2012; Rosewick et al., 2013; Gillet et al., 2016).

2.5 INFECÇÃO E PATOGÊNESE NO HOSPEDEIRO NATURAL

Sendo um vírus envelopado, o VLB necessita da ação sucessiva das glicoproteínas SU (proteína de superfície) e TM (proteína transmembrana) que se apresentam ancoradas na bicamada lipídica. Como já citado, essas glicoproteínas derivam da clivagem pós-transcricional do precursor do gene *env* (Wallin et al., 2004; Li et al., 2007).

Os mecanismos específicos de entrada ainda não são bem descritos. O que se sabe é que há uma interação entre o domínio de ligação ao receptor SU (Receptor-binding Domain- RBD) com os receptores específicos das células-alvo. Ocorre uma mudança na conformação induzida por essa interação, iniciando assim o processo de fusão direcionado pela TM. Antes da interação de SU, o peptídeo de TM, responsável pela fusão, se mantém oculto, desta forma, TM permanece em um estado fusogênico-inativo metaestável. Depois que a ligação do receptor ocorre, a ponte dissulfeto que liga SU e TM é interrompida, permitindo que TM sofra um redobramento para uma configuração fusogênica (Wallin et al., 2006; Li et al., 2007).

O peptídeo de fusão, localizado na região amino-terminal da TM, provoca uma desestabilização da membrana celular, gerando uma abertura na bicamada lipídica que resulta na liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira. Para que esse processo ocorra, é necessário a formação de um feixe espiral de seis hélices que aproxima a membrana viral com seu alvo, desencadeando a fusão da membrana (Wallin et al., 2006; Li et al., 2007).

O linfócito B é o principal alvo do VLB, embora já tenha sido mostrado que ele também é capaz de infectar outros tipos de células, como monócitos, granulócitos e linfócitos T CD8. Após entrar na célula, o genoma (RNA) viral é convertido em DNA através da ação da transcriptase reversa codificada pelo vírus. Em seguida, ocorre uma replicação viral intensa e precoce para a expressão dos vírions, infecção dos linfócitos alvo, transcrição reversa e ligação do provírus no genoma do hospedeiro (Florins et al., 2007).

Devido à grande quantidade de clones gerados nesta fase inicial da infecção, observa-se um considerável aumento da carga viral, que atinge seu pico máximo de 4 a 8 semanas após o início da infecção. Após as respostas imunes humorais e celulares do hospedeiro serem ativadas, ocorre uma diminuição considerável dos

clones gerados na fase inicial, provocando uma diminuição significativa na carga viral. A infecção se espalha através da expansão clonal das células infectadas, sem indicativo de transcrição reversa (Florins et al., 2007; Gillet et al., 2013).

Um fato interessante que ocorre na infecção pelo VLB é a falta de expressão das proteínas virais em qualquer estágio da doença. Foi observado que os linfócitos B, que abrigam o provírus, não produzem níveis de proteínas ou RNA viral detectáveis *in vivo*. Isso ocorre devido aos intensificadores localizados na região LTR, que mantém a atividade transcricional basal do promotor aumentada, porém com a atividade de replicação viral *in vivo* reduzida (Aida et al., 2013).

A patogenicidade do VLB em bovinos é mínima, que resulta em aproximadamente 70% do gado infectado sem apresentar qualquer manifestação clínica. Apenas um terço do gado infectado apresenta em seu sangue periférico um aumento permanente e relativamente estável no número de linfócitos B, processo denominado de Linfocitose Persistente. Isto ocorre a partir da quebra da homeostase dos linfócitos B, ou seja, pelo desequilíbrio entre a taxa de proliferação e apoptose dessas células (Juliarena et al., 2017).

O processo tumoral ocorre em aproximadamente 1% a 5% dos animais infectados. Neste caso, ocorre o acúmulo de linfócitos transformados em um ou mais órgãos após um período de latência relativamente longo, podendo variar de 1 a 8 anos. As regiões e órgãos mais afetados geralmente são abdômen, coração, nódulos linfáticos viscerais e periféricos, baço, útero e rins, porém, essas lesões que aparecem como massas tumorais brancas e firmes ou como infiltrado tecidual difuso, podem aparecer em diversos outros órgãos. Como consequência, o desenvolvimento desses tumores em órgãos vitais leva a uma série de problemas funcionais que culminam no falecimento do animal (Gillet et al., 2007; Juliarena et al., 2017).

2.6 TRANSMISSÃO

O VLB está presente nos linfócitos circulantes no sangue periférico de bovinos infectados e a interação célula a célula é a forma mais eficiente de transmissão pelo BLV. Desta forma, a transmissão horizontal e vertical ocorre frequentemente através

do sangue infectado (Aida et al., 2013). A transmissão horizontal é a principal via de disseminação viral e ocorre através da transferência de células infectadas, seja de forma iatrogênica ou através de insetos hematófagos (Ooshiro *et al.*, 2013; Panei *et al.*, 2019). Devido ao fato do vírus livre ser instável, as células infectadas pelo VLB que estão presentes tanto no sangue como também no leite ou colostro, por exemplo, se apresentam como melhores veículos de transmissão natural (Petersen et al., 2018; Watanuki et al., 2019).

Como a infectividade depende da quantidade de células infectadas contidas no sangue, os animais com LP são geralmente mais propensos a transmissão. Além disso, procedimentos iatrogênicos que envolvem contato com o sangue, quando feitos sem a desinfecção adequada dos instrumentos, estão associados a transmissão comum do VLB (Juliarena et al., 2017).

A transmissão vertical também é uma forma comum de infecção entre os ruminantes. Quando em contato com bovinos suscetíveis, os linfócitos infectados que estão presentes no sangue, secreções ou excreções podem transmitir a infecção. A transmissão pode ocorrer através da placenta ou após o nascimento (transmissão pós-natal) por meio do aleitamento de bezerros com leite ou colostro de mães infectadas; porém, geralmente anticorpos específicos transferidos de forma passiva da mãe para o feto conferem imunidade aos bezerros (Petersen et al., 2018).

2.7 PREVALÊNCIA

Dados epidemiológicos mostram que o VLB está presente em quase todos os países do mundo e tem se espalhado através do comércio de animais reprodutores. Há uma variação nos níveis de infecção provocado pelo VLB não só entre países, como também dentro de suas regiões (OIE, 2018; OIE, 2020).

Programas de erradicação do VLB estabelecidos pelos membros da comunidade europeia, na segunda metade do século XX, foram bem-sucedidos, principalmente na Europa Ocidental. Porém, alguns países da Europa Oriental ainda apresentam a LEB, como Polônia, Ucrânia e Croácia (OIE, 2018; OIE, 2020).

Estudos de prevalência na América do Norte demonstraram a presença do VLB em 83,4% dos bovinos leiteiros e 39% dos rebanhos bovinos dos USA. No Canadá, o

percentual é menor, com 37% de vacas infectadas (VanLeeuwen et al., 2001; Polat et al., 2017). No México, o VLB está presente em gado leiteiro e de corte em regiões específicas do país (OIE, 2018).

Na América do Sul, as taxas de prevalência são altas, se fazendo presente em quase todos os países. Na Argentina, a prevalência a nível individual e de rebanho fica em torno de 74% e 90%, respectivamente (Polat et al., 2016). Nos países que fazem fronteira com o Brasil como Venezuela, Bolívia, Peru, Paraguai, Uruguai e Colômbia, por exemplo, as taxas individuais de infecção variam entre 19% e 54% (Polat et al., 2016). No Brasil, a prevalência desse vírus varia de estado para estado, variando de 17% a 60% (OIE, 2018).

2.8 PROCESSO CARCINOGENICO

Como já foi descrito, o VLB é estruturalmente semelhante ao HTLV-1 e provoca leucemia de células B de forma muito semelhante, tanto em bovinos como em ovinos. E, assim como o HTLV-1, o VLB provoca uma infecção assintomática de longos períodos, provocando leucemia/ linfoma em aproximadamente 5% dos bovinos (Radostits et al., 2007; Gillet et al., 2007).

Os ovinos são modelos experimentais muito utilizados para estudos com tumores induzidos por deltaretrovírus, pois, diferentemente do gado, as ovelhas têm uma resposta mais rápida (cerca de 20 meses) no desenvolvimento de leucemia/ linfoma. Consequentemente, esse modelo permite a observação de todos os estágios da infecção, desde o estado sadio (pré-infecção) até o desenvolvimento da leucemia/ linfoma terminal (Van den Broeke et al., 2010).

Apesar de tantos estudos envolvendo tanto o HTLV-1 quanto o VLB, ainda não se sabe os mecanismos-chave que estão envolvidos no processo de infecção inicial que levam ao desenvolvimento da leucemia. O que se sabe é que, nos estágios crônicos da infecção, o VLB promove a expansão clonal de linfócitos B resultando em uma quantidade excessiva de clones, que curiosamente, possuem um sítio particular e individual de integração proviral. Por conseguinte, após um longo período de incubação, um desses clones se expande provocando um acúmulo de células

malígnas no sangue periférico (leucemia) e/ ou em outros tecidos (linfoma) (figura 3) (Gillet et al., 2007; Gillet et al., 2011).

A constituição celular do tumor é proveniente, em sua maioria, de um clone maligno de linfócito B que abriga, principalmente, um único provírus integrado. Porém, os sítios de integração são variáveis, o que leva a crer que, os produtos que são codificados pelo vírus impulsionam essa expansão clonal e influenciam a progressão oncogênica (Aida et al., 2013). Neste caso, a proteína *tax* é o principal foco de pesquisas tanto com VLB quanto com o HTLV-1 devido ao seu possível potencial oncogênico (Arainga et al., 2012; Barez et al., 2015; Zyrianova and Kovalchuk, 2020).

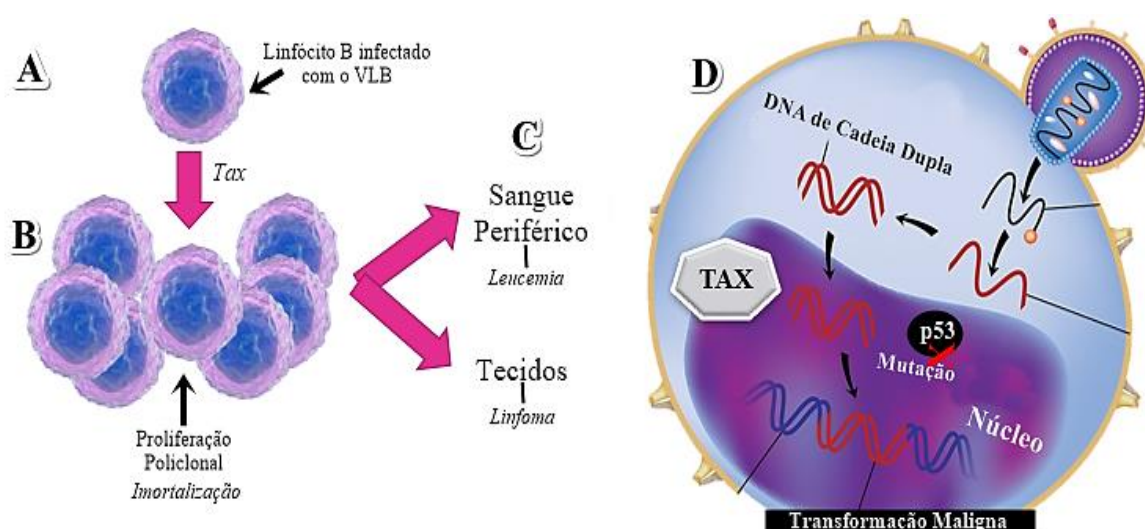


Figura 3: Fases da Indução da leucomogênese induzida pelo VLB: (A) Linfócito B com pelo menos um provírus integrado em seu genoma que, (B) após a ação de suas proteínas regulatórias, especialmente *tax*, inicia o processo de imortalização e proliferação policlonal, gerando o quadro de linfocitose persistente; (C) esses clones invadem o sangue periférico e/ou tecidos, e sofrem transformação maligna (5% dos casos), provocando leucemia ou linfoma, respectivamente, através (D) da possível ação de *tax* em conjunto com fatores específicos, como uma mutação na p53 (Fonte: Próprio autor).

Experimentos com células de roedores *in vitro*, mostraram que *tax* é capaz de imortalizar células, e em camundongos transgênicos, é capaz de induzir tumores, estimulando ainda mais a hipótese de sua contribuição no processo oncogênico (Barez et al., 2015). No VLB, *tax* é responsável pela ativação não só da transcrição do provírus como também de outros genes do hospedeiro. Além disso, a *tax* do HTLV-1 promove a progressão do ciclo celular e também interage no processo de reparo de DNA (Klener et al., 2006; Matsuoka and Yasunaga, 2013).

Um fato intrigante sobre a *tax* do VLB e HTLV-1 é a sua falta de expressão em boa parte das neoplasias, e também uma alta frequência do provírus contendo

alterações que a inativam (Barez et al., 2015). Isso pode ser explicado, talvez pelo fato de que, apesar de *tax* fornecer uma vantagem proliferativa ao clone infectado, o mesmo se torna alvo da resposta imune citotóxica. Neste caso, acredita-se que possa haver uma vantagem para o vírus quando *tax* é silenciado, pois assim, o vírus é capaz de evitar a resposta imune do hospedeiro, ou seja, é provável que o papel essencial de *tax* seja nos estágios iniciais do processo oncogênico (Gillet et al., 2007).

Os dados relacionados a neoplasia induzida por VLB ainda são muito limitados. Neste caso, supõe-se que a infecção provocada pelo VLB não é um fator crucial para o desenvolvimento do tumor devido ao fato de que anos separam o início da infecção da neoplasia propriamente dita, ou seja, são necessários fatores secundários para que haja a transição para uma neoplasia, como por exemplo, instabilidades no genoma ou mutações na p53 (Aida et al., 2013; Rosewick et al., 2013).

2.9 VLB E O CÂNCER DE PULMÃO

Sabe-se que infecções por agentes virais são responsáveis por aproximadamente 20% dos cânceres em humanos, tais como o vírus *Epstein-Barr*, o *Papilomavírus humano* (HPV), os vírus da hepatite B e C, retrovírus como o HTLV-1 e, além destes, bactérias como *Helicobacter pylori* e parasitas como *Schistosoma haematobium* e *Clonorchis sinensis* (IARC- International Agency for Research on Cancer, 2020). Porém, mesmo diante dessas evidências, agentes infecciosos ainda não são comprovadamente associados ao câncer de pulmão, ou seja, existem vários estudos que demonstram possíveis associações virais com o câncer de pulmão e que levantam essa questão (Robinson et al., 2016; Sigel et al., 2016; de Oliveira et al., 2018; Kheir et al., 2019)

As pesquisas que correlacionam o VLB com cânceres humanos ainda são escassas e controversas. Alguns estudos já encontraram o DNA do VLB em amostras de câncer de mama (Buehring et al., 2014; Buehring et al., 2015; Buehring, 2017; Schwingel et al., 2019), embora resultados semelhantes não tenham sido observados por Zhang e colaboradores (2016). E, além destes, o VLB também foi recentemente encontrado em sangue humano (Buehring et al., 2019).

Como já foi dito, a relação entre o câncer de pulmão e agentes infecciosos ainda não está totalmente esclarecida. A maioria dos estudos estão focados em outros microorganismos, como por exemplo, o HPV (Zhai et al., 2015; Xiong et al., 2017; de Oliveira et al., 2018). Estudos de associação entre o VLB e o câncer de pulmão ainda estão em fases iniciais, são escassos e controversos. Até agora, dois estudos realizaram este tipo de pesquisa. O trabalho coreano que analisou 162 amostras de câncer de pulmão não encontrou o material genético do VLB nas mesmas (Lee et al., 2005). Conflitante a este, um estudo americano que trabalhou com amostras de pulmão (neoplásicos e não-neoplásicos) detectou o material viral do VLB em amostras de câncer de células escamosas (80%) (Robinson et al., 2016), deixando assim a questão de um possível papel do VLB neste processo carcinogênico.

O câncer de pulmão é uma doença que, apesar de ser multifatorial, ainda não possui evidências suficientes que confirmem que alguns agentes infecciosos, como HPV, o vírus Epstein–Barr e o VLB por exemplo, possam também ser fatores de risco para seu desenvolvimento. E, diante da escassez de estudos que relacionem a presença do VLB a tecidos e cânceres humanos, especialmente no caso do câncer de pulmão, faz-se necessário mais pesquisas que trabalhem e forneçam mais evidências que comprovem, ou refutem, a possível ação deste vírus no câncer de pulmão humano.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença do Vírus da Leucose Bovina (VLB) em amostras de tecido pulmonar provenientes do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1** Realizar a detecção DNA do VLB a partir do DNA extraído de amostras histológicas de tecido pulmonar;
- 2** Verificar a frequência do VLB aos diagnósticos histológicos dos pacientes;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS ANALISADAS

Foram analisadas 75 amostras de DNA, provenientes de biópsias pulmonares de pacientes de ambos os sexos, com idade entre 11 e 81 anos (M_e : 55), atendidos no setor de pneumologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, localizado no Campus da Universidade de Pernambuco, situada na cidade do Recife, estado de Pernambuco, Brasil.

Dentre as biópsias analisadas, 10 são de carcinomas de células pequenas, 49 são de carcinomas de células não-pequenas, 2 amostras são de tecido pulmonar normal, além de 8 amostras, nas quais estavam classificadas apenas como “tumores pulmonares” e 6 sem dados histológicos. O DNA dos 75 espécimes de ressecção pulmonar parafinados já havia sido extraído previamente pelo nosso grupo de pesquisa para a realização de um estudo também de detecção, porém para o HPV (de Oliveira et al., 2018).

Para validação dos resultados, foi utilizado como amostra padrão o DNA proviral extraído de cultura de células FLK (linhagem celular de rim fetal de ovinos) infectadas com o VLB, concedidas pelo Laboratório de Virologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (CAAE: 06396812.0.0000.5208). Os pacientes foram informados sobre o tipo de pesquisa e os que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA genômico do material parafinado foi efetuada com o QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. Para a amostra padrão, foi extraído DNA a partir de 500 µL de cultura de células FLK utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a extração, o DNA então foi submetido a quantificação por espectrofotometria (NanoVue Plus Spectrophotometer) para verificação de sua concentração (ng/µL) e pureza (razão de absorbância A_{260}/A_{280}). Em seguida, para avaliação de sua qualidade, foi amplificado o gene da β -globina, utilizando um par de *primer* que amplifica fragmento de 110 pb (Baldez et al., 2009). As condições da PCR foram as seguintes: 95°C durante 5 minutos; seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C; e extensão final de 5 minutos a 72°C. O produto foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 2% corado em brometo de etídeo, por 40 min a 100 volts.

4.4 DETECÇÃO DO VLB

O processo de detecção do VLB foi realizado através da técnica *nested* Polimerase Chain Reaction (PCR). Foram utilizados *primers* específicos para os genes *Tax* e *Gag* baseadas nas condições estabelecidas no trabalho de Buehring e colaboradores (2014). E, além destes, também foi utilizado os *primers Tax* referentes ao trabalho de Khalilian e colaboradores (2019), que apresentam os produtos de PCR externo (primeira etapa) e interno (segunda etapa) maiores (Quadro 3).

Foram feitos ajustes nas temperaturas de anelamento dos *primers* internos do trabalho de Buehring e colaboradores (2014): 60°C / 30s para *Tax* e 62°C / 30s para *Gag*. E as temperaturas de anelamento dos *primers* externos e internos do trabalho de Khalilian e colaboradores (2019) também sofreram modificações para esse trabalho: 55°C / 30s (externo) e 60°C 30s (interno).

A reação da PCR foi preparada para um volume final de 25 µL em tubos de 0,2 µL. As condições da PCR para todos os *primers* foram: desnaturação inicial (95°C / 2 min), seguida de 30 ciclos de desnaturação (95°C / 30 s), anelamento (55°C / 30 s) e extensão (72°C / 20 s); e uma extensão final (72°C / 5 min) na primeira etapa. Já na segunda etapa, manteve-se as mesmas condições descritas, havendo variação apenas nas temperaturas de anelamento dos primers, sendo (60°C / 30 s) Tax e (62°C / 30 s) para o primer Gag (Buehring et al., 2014), e (60°C / 30 s) para Tax (Khalilian et al., 2019).

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. A confirmação da detecção do material viral se deu a partir da amplificação dos tamanhos de pares de base, correspondentes aos genes analisados. Como controle positivo, foi utilizada a amostra padrão em todas as reações da nested PCR.

Quadro 2- Especificações dos *Primers* utilizados

PRIMERS	SEQUÊNCIA	TAMANHO (pb)	Referência
<i>β-globina</i>	F: ACACAACTGTGTTCACTAGC R: CAACTTCATCCACGTTCCACC	110pb	Baldez, et al., (2009)
<i>Tax</i> (Buehring et al. 2014)	F: CTTCTGGGATCCATTACCTGA R: GCTCGAAGGGGGAAAGTGAA F: ATGTCACCATCGATGCCTGG R: CATCGGCGGTCCAGTTGATA	373pb 113pb	Buehring et al., (2014)
<i>Tax</i> (Khalilian et al 2019)	F: GTTGTTGGTTGGGGGCCC R: GCGGGAGAGCCATTCAATTTTC F: -TCGACACCACGCTCACCTG R: TGC GTTACTAAGTTGTTCCAGGG	301pb 385pb	Khalilian et al., (2019)
<i>Gag</i>	F: AACACTACGACTTGCAATCC R: GGTCCTTAGGACTCCGTCG F: ACCCTACTCCGGCTGACCTA R: CTTGGACGATGGTGGACCAA	272pb	Buehring et al., (2014)

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BIÓPSIAS ANALISADAS

Foi feita a análise total de 75 amostras de DNA, originárias de biópsias de tecido pulmonar, por meio da técnica nested PCR. Foram 49 biópsias de carcinoma de células não- pequenas, 10 de carcinoma de células pequenas, 8 biópsias de tumores pulmonares, nas quais não haviam especificação da classificação histológica

ao qual pertenciam, 2 amostras normais, além de 6 amostras sem o dado histológico. As biopsias são de pacientes com idades entre 11 e 81 anos (M_e : 55), e de ambos os sexos. Destas, 46 foram provenientes do sexo masculino (61,3%) com idades de 11 a 81 anos, e 29 do sexo feminino (38,7%), com idades de 20 a 79 anos.

Na análise dos prontuários, em relação ao tabagismo, dos pacientes com carcinoma de células pequenas, 30% ainda fazem o uso do cigarro, 20% são ex-fumantes, 20% nunca fumaram e 30% não constava tal informação no prontuário. Dos pacientes com carcinoma de células não-pequenas, 22,4% são fumantes, 26,5% são ex-fumantes, 28,6% nunca fumaram, sendo que 22,4% não constavam esse dado. Os ex-fumantes, em média, fumaram por 20 anos e estão há aproximadamente 8 anos sem fumar. Já os dados dos fumantes indicaram um tempo de uso do tabaco de 10 a até 60 anos, com uma média geral de 38 anos de consumo de cigarro. O resumo destes dados está contido na tabela 1.

Tabela 1. Dados gerais das biópsias

Nº DE AMOSTRAS	HISTOLOGIA		SEXO		IDADE	TABAGISMO				REGIÕES DO GENOMA (VLB)	
			FEM	MAS		FUMANTE	EX-FUMANTE	NUNCA FUMOU	SEM DADOS	TAX	GAG
10	Carcinoma de Células Pequenas		4	6	17 a 63	3	2	2	3	-	-
22	Carcinoma de Células Não-Pequenas	Adenocarcinoma	9	13	11 a 76	4	8	8	2	3	-
18		Carcinoma Escamoso	5	13	28 a 81	4	3	5	6	-	-
5		Carcinoma de Células Grandes	3	2	46 a 76	3	-	1	1	-	-
2		Carcinoma Neuroendócrino de Células Grandes	-	2	23 e 60	-	1	-	1	1	-
1		Carcinoma de Células Não- Pequenas Indiferenciado	1	-	69	-	-	-	1	-	-
1		Carcinoma Epidermóide	-	1	80	-	1	-	-	-	-
2	Sem Tumor		1	1	46/*	-	1	-	1	1	-
8	Tumor de Pulmão (não especificado)		3	5	51 a 72	2	4	2	-	-	-
6	Sem Resultado Histológico		3	3	41 a 76	3	2	-	1	-	-
TOTAL: 75			29	46		19	22	18	16	5	

* Ausência da informação

5.2 DETECÇÃO DO DNA DO VLB NAS AMOSTRAS DE PULMÃO

Foram utilizados os *primers Tax* e *Gag* tendo como objetivo a detecção do DNA proviral no material biológico analisado.

Foram utilizados dois primers de *Tax* referentes aos trabalhos de Buehring e colaboradores (2014), de fragmento com 113 pb, e Khalilian e colaboradores (2019), de fragmento com 301 pb. Como resultado, o DNA do VLB foi encontrado em 5 das 75 amostras analisadas (6,67%) utilizando os *primers* citados. A *nested PCR* foi repetida utilizando apenas as amostras que amplificaram, para confirmação do resultado e confecção do gel representativo (Figura 2).

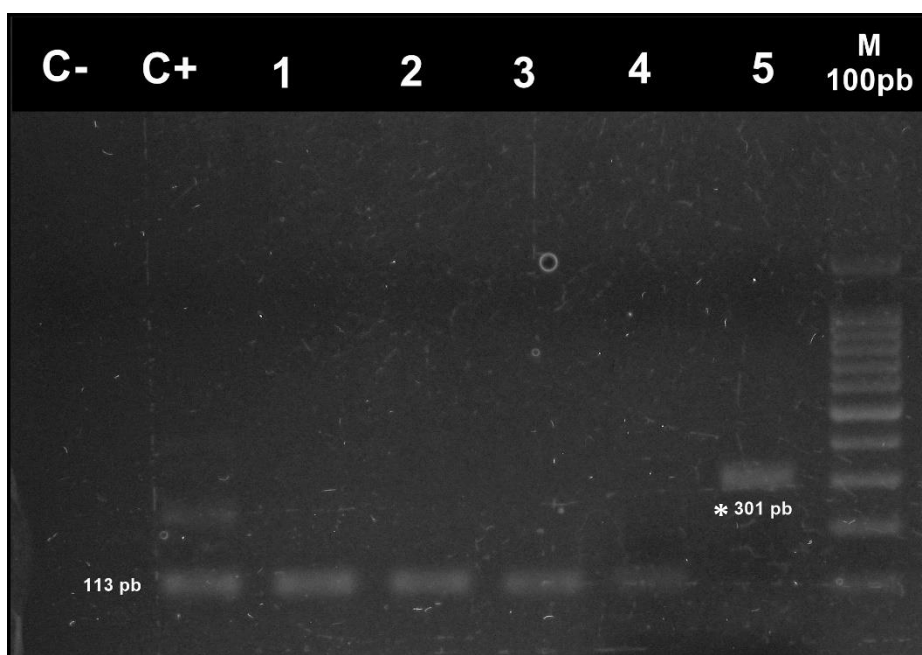


Figura 4: Detecção do DNA do VLB em amostras de tecido pulmonar com uso do primer *Tax* (gel representativo). (C-) controle negativo; (C+) controle positivo; (1- 5) amostras positivas. * O produto da amostra 5 é maior pois é referente ao primer *Tax* do trabalho de Khalilian et al., (2019).

Foi realizada a *nested* PCR utilizando o *primer* *Gag*, porém não houve amplificação. O gel representativo (figura 3), nos mostra apenas a amplificação da amostra padrão.

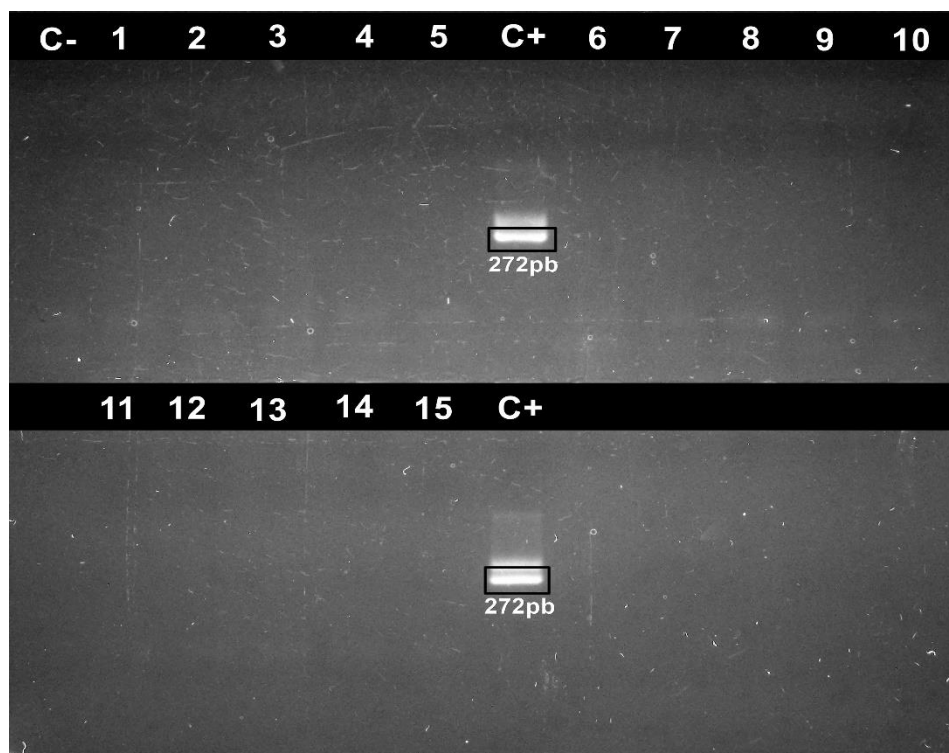


Figura 5: Detecção do DNA do VLB em amostras de tecido pulmonar com uso do primer *Gag* (gel representativo). (C-) controle negativo; (C+) controle positivo; (1-15) amostras sem amplificação.

5.3 ANÁLISE DIAGNÓSTICA DAS AMOSTRAS POSITIVAS

A análise comparativa entre as amostras positivas para o DNA do VLB e os resultados histológicos contidos dos prontuários demonstrou que, das 5 amostras que amplificaram, 80% são de carcinoma de células não- pequenas, mais especificamente 3 adenocarcinomas e 1 carcinoma neuroendócrino de células grandes. Além destes, uma das biópsias que foram positivas é de tecido pulmonar normal, como mostrado no quadro 4. Foram analisados, um total de 22 adenocarcinomas e 13, 63% foram positivos para o DNA do VLB.

Tabela 2. Dados e diagnósticos histológicos das amostras positivas para o VLB

<i>Número da amostra</i>	Diagnóstico Histológico	Idade	Uso do cigarro
1	Carcinoma neuroendócrino de células grandes	60	Ex- fumante
2	Sem tumor	46	Ex- fumante
3	Adenocarcinoma	68	Sd*
4	Adenocarcinoma	74	Ex- fumante
5	Adenocarcinoma	57	Não fumante

Sd*: Sem dados

Através dos dados dos prontuários, foi analisado a conduta dos pacientes, dos quais se originaram as biopsias. Os pacientes referentes as amostras “1” e “4” alegaram serem ex-fumantes depois de terem fumado por cerca de 10 anos, porém não possuem histórico de câncer de pulmão na família. O paciente referente a amostra “2” (amostra normal) também alegou ser ex-fumante e sem casos de câncer de pulmão na família. A amostra “3” não apresentava dados extras além da idade. Já o paciente “5” alegou ser não fumante e, também, não apresenta histórico de câncer de pulmão na família.

6 DISCUSSÃO

O interesse sobre uma possível capacidade do VLB de infectar humanos vem aumentando consideravelmente nos últimos anos (Buehring et al., 2003; Buehring et al., 2014; Buehring et al., 2015; Buehring et al., 2017; Buehring et al., 2019). Desde que foi identificado no gado, pesquisas iniciais foram feitas a fim de identificar a presença desse vírus em células humanas, porém sem sucesso (Ressang, 1977; Kettmann et al., 1978; OLSON et al., 1978; Thiry et al., 1985; Bender et al., 1988). É provável que o vírus não tenha sido identificado na época, devido à falta de técnicas mais sensíveis, como a PCR e sequenciamento.

A hipótese de que o VLB poderia infectar humanos foi levantada devido a alguns fatores, como a semelhança do VLB com o HTLV-1 (vírus que infecta linfócitos T provocando linfoma em humanos), o fato do vírus ser transmitido verticalmente entre os bovinos através do leite (Gutiérrez et al., 2015; Olaya-Galán et al., 2017; Watanuki et al., 2019), sua capacidade de infectar outras espécies naturalmente, como búfalos, zebus e capivaras, e experimentalmente, como ovelhas, cabras, porcos, coelhos, ratos e galinhas (Aida et al., 2013), e também, pela capacidade do vírus, principalmente os oncogênicos, de cruzarem espécies espontaneamente (Christou, 2011).

Ainda não há evidências concretas de qual seria o mecanismo de transmissão do VLB para os seres humanos, porém algumas hipóteses foram levantadas por Buehring e colaboradores (2017). Uma delas seria a transmissão através do consumo de produtos derivados de bovinos infectados com o VLB (Buehring, 2017). Este caso implica no consumo da carne mal cozida e leite não pasteurizado, hipótese que levou Olaya- Galán e colaboradores (2017) a investigarem a carne crua e leite fresco e identificarem a presença do material genético referente ao gene *Gag* do VLB nas amostras analisadas (Olaya-Galán et al., 2017). Além disso, Buehring e colaboradores (2004) identificaram em soro humano, por meio de imunoblotting, anticorpos contra antígeno do capsídeo do VLB (p24), fortificando ainda mais a hipótese de que os seres humanos entram em contato com o VLB.

Os trabalhos que relacionam a presença do VLB a carcinomas pulmonares são escassos e, além disso, possuem resultados controversos. Até o momento, dois artigos realizaram a detecção do VLB em tecido pulmonar humano. Um deles,

realizado por Robinson e colaboradores (2016), que avaliou 70 carcinomas de pulmão de células não pequenas, por meio de microarray, encontrou apenas 8 amostras positivas para o VLB. Em contraste, o trabalho de Lee e colaboradores (2005) que, através de PCR, analisou 517 amostras de leucemia e 162 de câncer de pulmão, não encontrou o DNA proviral do VLB. Estes dados da literatura nos mostram que não há uma prevalência considerável do DNA do VLB em tecidos pulmonares, e nos levou a esperar poucas amostras positivas, o que de fato realmente ocorreu.

Em nossos resultados, o DNA do VLB foi encontrado em 5/75 (6,67%) amostras de tecido pulmonar utilizando o *primer Tax*. A escolha desse primer ocorreu devido essa região ser bem conservada, sua probabilidade de ser excluída do genoma no processo de integração ser bem menor e, além disso, é a região mais utilizada na literatura para detecção do VLB. O DNA proviral do VLB foi detectado em amostras de adenocarcinoma (3/5), carcinoma neuroendócrino de células grandes (1/5) e em uma amostra normal (1/5). É possível observar que, de todas as biópsias de tumor analisadas, obtivemos resultados positivos apenas em CCNP. Em nosso estudo, o DNA do VLB foi encontrado em maior quantidade em adenocarcinomas (60%), dado este que difere da literatura que temos até agora, no qual, no trabalho de Robinson e colaboradores (2016), o DNA proviral do VLB foi encontrado em apenas CCE. No entanto, um estudo de revisão de Palmarini e Hung (2001) descreveu sobre a capacidade de alguns retrovírus de infectar e provocar adenocarcinomas pulmonares em ovinos, que possuem algumas semelhanças histopatológicas com alguns tipos de adenocarcinomas humanos, como o adenocarcinoma acinar e papilar, por exemplo.

Está bem estabelecido que o adenocarcinoma é a forma de câncer de pulmão mais comum tanto em fumantes, como em ex- fumantes, não fumantes e em fumantes passivos (de Groot et al., 2018). Verificando novamente a tabela 2, conseguimos observar que a maioria das amostras positivas para o VLB são de ex- fumantes, inclusive um dos adenocarcinomas. Porém, uma das amostras de adenocarcinoma com a presença do DNA proviral do VLB é de um paciente não fumante e sem histórico de câncer de pulmão na família. Este caso chama atenção para os demais fatores que poderiam levar ao desenvolvimento desse tipo de neoplasia, como genética (neste caso excluindo o histórico familiar), inflamações crônicas, radiações ionizantes, e também, os relacionados com a presença viral, que ainda estão sendo investigados (Sun et al., 2007; Robinson et al., 2016; de Freitas et al., 2016; de Oliveira et al., 2018; Kim et al., 2018) e que, provavelmente, podem estar relacionados a esse caso.

Cogita-se que a presença viral pode ser um agente, que junto aos demais fatores de risco, aumente a probabilidade de desenvolvimento de tumor devido as alterações moleculares que certos retrovírus, como o VLB, são capazes de promover nas células infectadas. Os retrovírus oncogênicos tem a capacidade de induzir tumores integrando seu DNA (provírus) ao genoma do hospedeiro, provavelmente por acaso, próximo a proto-oncogenes celulares. O que se sabe é que existem aproximadamente mais de 70 proto-oncogenes, como o c-myc e KRas, que são ativados por provírus e que, também, exercem papel no desenvolvimento do carcinoma pulmonar de células pequenas (Oxnard et al., 2013).

Além disso, já foi observado que a presença de alguns vírus, inclusive o VLB, pode alterar a expressão de alguns genes em cânceres de pulmão de células não pequenas. No trabalho de Kim e colaboradores (2018) foi feita uma extensa análise de expressão gênica e observaram que o VLB, em carcinoma escamoso, provoca alterações na expressão de vários genes, como por exemplo, o CPB2 que é um gene regulado pela matriz extracelular e foi considerado um indicador de função pulmonar comprometida (Lim et al., 2017) e o NFATc1 que é um oncogene envolvido em várias funções no câncer (Bhattacharyya et al., 2011; Im et al., 2016; Kim et al., 2018). Da mesma forma, algumas proteínas do VLB, principalmente *tax*, atuam no processo de sobrevivência celular por meio da ativação do fator de transcrição NF- κ B, aumentam a transcrição de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, e a expressão de TNF- α (Aida et al., 2013), e também, como já foi citado, altera a expressão de oncogenes como CPB2 e NFATc1 (Kim et al., 2018).

Apesar de poucos, outros trabalhos também investigaram a presença do VLB em outros tipos de tecido. O mais estudado, até o momento, são os tumores de mama, que também apresentam resultados conflitantes, porém, com mais resultados positivos para a presença viral. Buehring e colaboradores (2014) encontraram o DNA viral em epitélio secretor da mama e, este mesmo grupo de pesquisa publicou recentemente (2017) um estudo retrospectivo que identificou o VLB em amostras num período de 3 a 10 anos antes do desenvolvimento do câncer de mama, sugerindo assim, uma relação temporal causal entre a infecção por VLB e o subsequente desenvolvimento do câncer. E, no início de 2019, Schwingel e colaboradores também identificaram esse vírus em amostras de mama no sul do Brasil.

Buehring e colaboradores (2019) também identificaram o VLB em amostras de sangue humano, levantando uma possível questão sobre uma provável infectividade

deste vírus em células sanguíneas (leucócitos) e a hipótese de uma possível forma de disseminação viral para os tecidos através destas células. Este resultado, talvez, possa considerar o sangue como uma das vias das quais o VLB pode utilizar para atingir e, provavelmente, se estabelecer em órgãos internos.

Apesar da identificação de amostras positivas utilizando o primer *Tax*, não obtivemos amostras positivas para *Gag*. Isso se deve, provavelmente, porque este gene, assim como o gene *Pol*, é frequentemente deletado durante a progressão de leucemias e linfomas para estágios avançados, como uma forma de defesa viral contra a resposta imune do hospedeiro, assim como ocorre com o HTLV-1 (Kamihira et al., 2005; Gillet et al., 2007).

De acordo com zur Hausen (2011), a presença de agentes infecciosos em tumores faz deles prováveis indutores oncogênicos, seja direta ou indiretamente. Porém, para que o papel causal de um agente infeccioso na carcinogênese seja confirmado ou refutado, é necessário que estudos futuros enquadrem o vírus, neste caso o VLB, em uma série critérios específicos descritos no artigo de Evans e Mueller (1990). Porém, identificar a presença viral em tumores pulmonares é um grande passo e abre espaço para a realização de estudos funcionais futuros que possam confirmar, ou negar, o papel do VLB na carcinogênese.

7 CONCLUSÕES

- Por meio deste trabalho, foi possível identificar, pela primeira vez no Brasil, a presença do material genético do VLB em amostras de tecido pulmonar humano, tumorais e não tumorais, com frequência de 6,67%.
- A presença do DNA proviral do VLB foi identificada em quatro amostras de carcinoma de células não pequenas, nas quais três são de adenocarcinoma (60%) e uma é de carcinoma neuroendócrino de células grandes (20%). E, além destas, o DNA do VLB também foi identificado em uma amostra normal.
- Apesar da baixa frequência (6,67%), esse dado nos fornece a evidência de que o VLB pode infectar humanos e alcançar órgãos como o pulmão, além de outros tecidos como mama e sangue (como já documentado na literatura).
- Este achado levanta a hipótese da possível ação, direta ou indireta, do VLB na carcinogênese pulmonar e abre caminho para estudos mais aprofundados para confirmar ou refutar um possível potencial de contribuição viral nessa neoplasia.

REFERÊNCIAS

- ADCOCK, I. M.; CARAMORI, G.; BARNES, P. J. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer: New Molecular Insights. **Respiration**, v. 81, n. 4, p. 265–284, mar. 2011.
- AIDA, Y.; MURAKAMI, H.; TAKAHASHI, M.; TAKESHIMA, S.-N. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 328, 2013.
- AMOS, C. I. *et al.* Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1. **Nature Genetics**, v. 40, n. 5, p. 616–622, 2 maio 2008.
- AMOS, C. I. *et al.* A susceptibility locus on chromosome 6q greatly increases lung cancer risk among light and never smokers. **Cancer Research**, v. 70, n. 6, p. 2359–2367, 15 mar. 2010.
- ARAINGA, M.; TAKEDA, E.; AIDA, Y. Identification of bovine leukemia virus tax function associated with host cell transcription, signaling, stress response and immune response pathway by microarray-based gene expression analysis. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 121, 28 mar. 2012.
- AVIDAN, O.; ENTIN MEER, M.; OZ, I.; HIZI, A. The processivity and fidelity of DNA synthesis exhibited by the reverse transcriptase of bovine leukemia virus. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 3, p. 859–867, 1 fev. 2002.
- BAGNARDI, V. *et al.* Alcohol consumption and site-specific cancer risk: A comprehensive dose-response meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. 3, p. 580–593, 3 fev. 2015.
- BAILEY-WILSON, J. E. *et al.* A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25. **American Journal of Human Genetics**, v. 75, n. 3, p. 460–474, 2004.
- BAREZ, P. Y. *et al.* Recent advances in BLV research. **Viruses**, v. 7, n. 11, p. 6080–6088, 24 nov. 2015.
- BENDER, A. P.; ROBISON, L. L.; KASHMIRI, S. V.; MCCLAIN, K. L.; WOODS, W. G.; SMITHSON, W. A.; HEYN, R.; FINLAY, J.; SCHUMAN, L. M.; RENIER, C.; GIBSON, R. No involvement of bovine leukemia virus in childhood acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer research**, v. 48, n. 10, p. 2919–22, 15 maio 1988.
- BHATTACHARYYA, S. *et al.* NFATc1 affects mouse splenic B cell function by controlling the calcineurin-NFAT signaling network. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 4, p. 823–839, 2011.
- BROEKE, A. VAN DEN; OUMOUNA, M.; BESKORWAYNE, T.; SZYNAL, M.; CLEUTER, Y.; BABIUK, S.; BAGNIS, C.; MARTIAT, P.; BURNY, A.; GRIEBEL, P. Cytotoxic responses to BLV tax oncoprotein do not prevent leukemogenesis in sheep. **Leukemia Research**, v. 34, n. 12, p. 1663–1669, 1 dez. 2010.
- BUEHRING, G. C. Response to “Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients”. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 24, 7 dez. 2017.
- BUEHRING, GERTRUDE C.; DELANEY, A.; SHEN, H.; CHU, D. L.; RAZAVIAN, N.; SCHWARTZ, D. A.; DEMKOVICH, Z. R.; BATES, M. N. Bovine leukemia virus discovered in human blood. p. 1–10, 2019.
- BUEHRING, GERTRUDE C.; DELANEY, A.; SHEN, H.; CHU, D. L.; RAZAVIAN, N.; SCHWARTZ, D. A.; DEMKOVICH, Z. R.; BATES, M. N. Bovine leukemia virus discovered in human blood. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 297, 2 dez. 2019.
- BUEHRING, G. C.; PHILPOTT, S. M.; CHOI, K. Y. Humans Have Antibodies Reactive with Bovine

Leukemia Virus. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 19, n. 12, p. 1105–1113, dez. 2003.

BUEHRING, G. C.; SHEN, H. M.; JENSEN, H. M.; CHOI, K. Y.; SUN, D.; NUOVO, G. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 5, p. 772–82, maio 2014a.

_____. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 5, p. 772–82, maio 2014b.

BUEHRING, G. C.; SHEN, H. M.; JENSEN, H. M.; JIN, D. L.; HUDES, M.; BLOCK, G. Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0134304, 2015a.

_____. Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0134304, 2015b.

BUEHRING, G. C.; SHEN, H.; SCHWARTZ, D. A.; LAWSON, J. S. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0179367, 2017.

BYUN, J. *et al.* Genome-wide association study of familial lung cancer. **Carcinogenesis**, v. 39, n. 9, 2018.

CARRERAS-TORRES, R. *et al.* Obesity, metabolic factors and risk of different histological types of lung cancer: A Mendelian randomization study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2017.

CHRISTOU, L. The global burden of bacterial and viral zoonotic infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 3, p. 326–330, mar. 2011.

COGLIANO, V. J. *et al.* Preventable Exposures Associated With Human Cancers. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 24, p. 1827–1839, 21 dez. 2011.

DOLL, R.; PETO, R.; BOREHAM, J.; SUTHERLAND, I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 328, n. 7455, p. 1519, 26 jun. 2004.

FLORINS, A. *et al.* Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, n. 1, p. 1520, 2007.

FREED, E. O. HIV-1 and the host cell: an intimate association. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 170–177, 1 abr. 2004.

FREITAS, A. C. DE; GURGEL, A. P.; LIMA, E. G. DE; FRANÇA SÃO MARCOS, B. DE; AMARAL, C. M. M. DO. **Human papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview** *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* Springer Verlag, , 1 dez. 2016.

GENBANK. **Vírus da leucemia bovina, genoma completo - Nucleotide - NCBI**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/9626225>>. Acesso em: 3 abr. 2020.

GILLET, N. *et al.* Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, v. 4, p. 18, 16 mar. 2007.

GILLET, N. A.; GUTIÉRREZ, G.; RODRIGUEZ, S. M.; BROGNIEZ, A. DE; RENOTTE, N.; ALVAREZ, I.; TRONO, K.; WILLEMS, L. Massive Depletion of Bovine Leukemia Virus Proviral Clones Located in Genomic Transcriptionally Active Sites during Primary Infection. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003687, 3 out. 2013.

GILLET, N. A.; HAMAIDIA, M.; BROGNIEZ, A. DE; GUTIÉRREZ, G.; RENOTTE, N.; REICHERT, M.; TRONO, K.; WILLEMS, L. Bovine Leukemia Virus Small Noncoding RNAs Are Functional Elements That Regulate Replication and Contribute to Oncogenesis In Vivo. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005588, 2016.

GILLET, N. A.; MALANI, N.; MELAMED, A.; GORMLEY, N.; CARTER, R.; BENTLEY, D.; BERRY, C.; BUSHMAN, F. D.; TAYLOR, G. P.; BANGHAM, C. R. M. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. **Blood**, v. 117, n. 11, p. 3113–22, 17 mar. 2011.

GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE GLOBAL STRATEGY FOR THE DIAGNOSIS, MANAGEMENT, AND PREVENTION OF CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (2018 REPORT). . [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.goldcopd.org>. Acesso em: 28 mar. 2020.

GONZALEZ, J.; MARÍN, M.; SÁNCHEZ-SALCEDO, P.; ZULUETA, J. J. **Lung cancer screening in patients with chronic obstructive pulmonary disease***Annals of Translational Medicine*AME Publishing Company, , 1 abr. 2016.

GRAVES, D. C.; FERRER, J. F. In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. **Cancer research**, v. 36, n. 11 Pt 1, p. 4152–9, 1 nov. 1976.

GROOT, P. M. DE; WU, C. C.; CARTER, B. W.; MUNDEN, R. F. The epidemiology of lung cancer. **Translational Lung Cancer Research**, v. 7, n. 3, p. 220–233, 1 jun. 2018.

GUTIÉRREZ, G.; LOMONACO, M.; ALVAREZ, I.; FERNANDEZ, F.; TRONO, K. Characterization of colostrum from dams of BLV endemic dairy herds. **Veterinary Microbiology**, v. 177, n. 3–4, p. 366–369, 12 jun. 2015.

HECHT, S. S.; SZABO, E. **Fifty years of tobacco carcinogenesis research: From mechanisms to early detection and prevention of lung cancer***Cancer Prevention Research*, 2014.

HUNG, R. J. *et al.* A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 633–637, 3 abr. 2008.

HWANG, K.; PAIK, S. S.; LEE, S. H. Impact of pulmonary tuberculosis on the EGFR mutational status and clinical outcome in patients with lung adenocarcinoma. **Cancer Research and Treatment**, v. 51, n. 1, p. 158–168, 1 jan. 2019.

IARC- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **World Cancer Report 2020**. [s.l.] International Agency for Research on Cancer, 2020.

IM, J. Y.; LEE, K. W.; WON, K. J.; KIM, B. K.; BAN, H. S.; YOON, S. H.; LEE, Y. J.; KIM, Y. J.; SONG, K. BIN; WON, M. DNA damage-induced apoptosis suppressor (DDIAS), a novel target of NFATc1, is associated with cisplatin resistance in lung cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 1, p. 40–49, 1 jan. 2016.

JI, X. *et al.* Identification of susceptibility pathways for the role of chromosome 15q25.1 in modifying lung cancer risk. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

JULIARENA, M. A.; BARRIOS, C. N.; LÜTZELSCHWAB, C. M.; ESTEBAN, E. N.; GUTIÉRREZ, S. E. **Bovine leukemia virus: Current perspectives***Virus Adaptation and Treatment*Dove Press, , 10 ago. 2017. Disponível em: <https://www.dovepress.com/bovine-leukemia-virus-current-perspectives-peer-reviewed-article-VAAT>. Acesso em: 12 jun. 2019

KAMIHIRA, S. *et al.* Proviral status of HTLV-1 integrated into the host genomic DNA of adult T-cell leukemia cells. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 27, n. 4, p. 235–241, 1 ago. 2005.

KETTMANN, R.; BURNY, A.; CLEUTER, Y.; GHYSDAEL, J.; MAMMERICKX, M. Distribution of bovine leukemia virus proviral sequences in tissues of bovine, ovine and human origin. **Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research**, v. 9, n. 4, p. 837–44, 1978.

KHEIR, F.; ZHAO, M.; STRONG, M. J.; YU, Y.; NANBO, A.; FLEMINGTON, E. K.; MORRIS, G. F.; REISS, K.; LI, L.; LIN, Z. Detection of epstein-barr virus infection in non-small cell lung cancer.

Cancers, v. 11, n. 6, 1 jun. 2019.

KIM, Y.; PIERCE, C. M.; ROBINSON, L. A. Impact of viral presence in tumor on gene expression in non-small cell lung cancer. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 843, 22 dez. 2018.

KINCAID, R. P.; BURKE, J. M.; SULLIVAN, C. S. RNA virus microRNA that mimics a B-cell oncomiR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 8, p. 3077–82, 21 fev. 2012.

KLEIN, F.; AMIN KOTB, W. F. M.; PETERSEN, I. Incidence of human papilloma virus in lung cancer. **Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 65, n. 1, p. 13–8, 1 jul. 2009.

KLENER, P. *et al.* Insights into gene expression changes impacting B-cell transformation: cross-species microarray analysis of bovine leukemia virus tax-responsive genes in ovine B cells. **Journal of virology**, v. 80, n. 4, p. 1922–38, fev. 2006.

KURMI, O. P.; LAM, K. B. H.; AYRES, J. G. **Indoor air pollution and the lung in low- and medium-income countries** **European Respiratory Journal** European Respiratory Society, , 1 jul. 2012.

LAIRMORE, M. D. Animal Models of Bovine Leukemia Virus and Human T-Lymphotropic Virus Type-1: Insights in Transmission and Pathogenesis. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 2, n. 1, p. 189–208, 18 fev. 2014.

LEE, L. C.; SCARRATT, W. K.; BUEHRING, G. C.; SAUNDERS, G. K. Bovine leukemia virus infection in a juvenile alpaca with multicentric lymphoma. **The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne**, v. 53, n. 3, p. 283–6, mar. 2012.

LEFÈBVRE, L.; VANDERPLASSCHEN, A.; CIMINALE, V.; HEREMANS, H.; DANGOISSE, O.; JAUNIAUX, J.-C.; TOUSSAINT, J.-F.; ZELNIK, V.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Oncoviral bovine leukemia virus G4 and human T-cell leukemia virus type 1 p13(II) accessory proteins interact with farnesyl pyrophosphate synthetase. **Journal of virology**, v. 76, n. 3, p. 1400–14, fev. 2002.

LI, K.; ZHANG, S.; KRONQVIST, M.; EKSTRÖM, M.; WALLIN, M.; GAROFF, H. The conserved His8 of the Moloney murine leukemia virus Env SU subunit directs the activity of the SU–TM disulphide bond isomerase. **Virology**, v. 361, n. 1, p. 149–160, 25 abr. 2007.

LIM, S. BIN; TAN, S. J.; LIM, W. T.; LIM, C. T. An extracellular matrix-related prognostic and predictive indicator for early-stage non-small cell lung cancer. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2017.

LOOMIS, D.; HUANG, W.; CHEN, G. The International Agency for Research on Cancer (IARC) evaluation of the carcinogenicity of outdoor air pollution: focus on China. **Chinese journal of cancer**, v. 33, n. 4, p. 189–96, abr. 2014.

MAEMONDO, M. *et al.* Gefitinib or Chemotherapy for Non–Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 25, p. 2380–2388, 24 jun. 2010.

MALHOTRA, J.; MALVEZZI, M.; NEGRI, E.; VECCHIA, C. LA; BOFFETTA, P. Risk factors for lung cancer worldwide. **The European respiratory journal**, v. 48, n. 3, p. 889–902, 1 set. 2016a.

_____. Risk factors for lung cancer worldwide. **European Respiratory Journal**, v. 48, n. 3, p. 889–902, 1 set. 2016b.

MARTINEZ CUESTA, L.; LENDEZ, P. A.; NIETO FARIAS, M. V.; DOLCINI, G. L.; CERIANI, M. C. Can Bovine Leukemia Virus Be Related to Human Breast Cancer? A Review of the Evidence. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 23, n. 3, p. 101–107, 18 set. 2018.

MATSUOKA, M.; YASUNAGA, J. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. **Current Opinion in Virology**, v. 3, n. 6, p. 684–691, 1 dez. 2013.

MATTEI, S.; SCHUR, F. K.; BRIGGS, J. A. **Retrovirus maturation - An extraordinary structural transformation** **Current Opinion in Virology** Elsevier B.V., , 1 jun. 2016.

MCKAY, J. D. *et al.* Large-scale association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci and heterogeneity in genetic susceptibility across histological subtypes. **Nature Genetics**, v. 49, n. 7, p. 1126–1132, 1 jul. 2017.

MILONE, M. C.; O'DOHERTY, U. **Clinical use of lentiviral vectors** *Leukemia* Nature Publishing Group, , 1 jul. 2018.

MOORE, J. X.; AKINYEMIJU, T.; WANG, H. E. Pollution and regional variations of lung cancer mortality in the United States. **Cancer Epidemiology**, v. 49, p. 118–127, 1 ago. 2017.

MUSOLF, A. M. *et al.* Parametric Linkage Analysis Identifies Five Novel Genome-Wide Significant Loci for Familial Lung Cancer. **Human Heredity**, v. 82, n. 1–2, p. 64–74, 1 set. 2016.

_____. **Familial lung cancer: A brief history from the earliest work to the most recent studies** *Genes* MDPI AG, , 17 jan. 2017.

NGUYÊN, T. L.-A.; CALOMME, C.; WIJMEERSCH, G.; NIZET, S.; VEITHEN, E.; PORTETELLE, D.; LAUNOIT, Y. DE; BURNY, A.; LINT, C. VAN. Deacetylase Inhibitors and the Viral Transactivator TaxBLV Synergistically Activate Bovine Leukemia Virus Gene Expression via a cAMP-responsive Element- and cAMP-responsive Element-binding Protein-dependent Mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 35025–35036, 13 ago. 2004.

OGAWA, Y.; SAGATA, N.; TSUZUKU-KAWAMURA, J.; KOYAMA, H.; ONUMA, M.; IZAWA, H.; IKAWA, Y. Structure of a Defective Provirus of Bovine Leukemia Virus. **Microbiology and Immunology**, v. 31, n. 10, p. 1009–1015, 1 out. 1987.

OIE. **OIE World Animal Health Information System**. Disponível em:

<https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statuslist>. Acesso em: 21 ago. 2019.

_____. **Chapter 3.4.9 Enzootic Bovine Leukosis**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.09_EBL.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2019.

_____. **Sistema de Informação Mundial de Saúde Animal da OIE**. Disponível em:

<https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=0&disease_id_restriction=35&species_t=0&disease_id_aquatic=-999&species_a=0&status_metho>. Acesso em: 9 abr. 2020.

OLAYA-GALÁN, N. N.; CORREDOR-FIGUEROA, A. P.; GUZMÁN-GARZÓN, T. C.; RÍOS-HERNANDEZ, K. S.; SALAS-CÁRDENAS, S. P.; PATARROYO, M. A.; GUTIERREZ, M. F. Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 15, p. 3125–3130, 1 nov. 2017.

OLIVEIRA, T. H. A. DE; AMARAL, C. M. DO; FRANÇA SÃO MARCOS, B. DE; NASCIMENTO, K. C. G.; MIRANDA RIOS, A. C. DE; QUIXABEIRA, D. C. A.; MUNIZ, M. T. C.; SILVA NETO, J. DA C.; FREITAS, A. C. DE. Presence and activity of HPV in primary lung cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 12, p. 2367–2376, 1 dez. 2018.

OLSON, C.; C, O.; DM, D. BOVINE LEUKOSIS: INVESTIGATION OF RISK FOR MAN. **BOVINE LEUKOSIS: INVESTIGATION OF RISK FOR MAN**, 1978.

OOSHIRO, M.; KONNAI, S.; KATAGIRI, Y.; AFUSO, M.; ARAKAKI, N.; TSUHA, O.; MURATA, S.; OHASHI, K. Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. **The Veterinary record**, v. 173, n. 21, p. 527, 30 nov. 2013.

OXNARD, G. R.; BINDER, A.; JÄNNE, P. A. New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, n. 8, p. 1097–1104, 10 mar. 2013.

- PANEI, C. J.; LARSEN, A. E.; FUENTEALBA, N. A.; METZ, G. E.; ECHEVERRÍA, M. G.; GALOSI, C. M.; VALERA, A. R. Study of horn flies as vectors of bovine leukemia virus. **Open Veterinary Journal**, v. 9, n. 1, p. 33–37, 2019.
- PETERSEN, M. I.; ALVAREZ, I.; TRONO, K. G.; JAWORSKI, J. P. Quantification of bovine leukemia virus proviral DNA using a low-cost real-time polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 6366–6374, 1 jul. 2018.
- PIERARD, V. *et al.* DNA cytosine methylation in the bovine leukemia virus promoter is associated with latency in a lymphoma-derived B-cell line: Potential involvement of direct inhibition of camp-responsive element (CRE)-binding protein/cre modulator/activation transcription factor binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 25, p. 19434–19449, 18 jun. 2010.
- PLUTA, A.; ROLA-ŁUSZCZAK, M.; DOUVILLE, R. N.; KUŹMAK, J. Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, p. 165, 25 dez. 2018.
- POLAT, M. *et al.* A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. **Retrovirology**, v. 13, p. 4, 12 jan. 2016.
- POLAT, M.; TAKESHIMA, S.-N.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology journal**, v. 14, n. 1, p. 209, 2017.
- RADOSTITS, O.; GAY, C.; GAY, C.; HINCHCLIFF, K.; CONSTABLE, P. A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats: veterinary medicine. **Veterinary Medicine**, v. 10, p. 2045–2050, 2007.
- RESSANG, A. A. [Examination for evidence of infection of humans with bovine leukemia virus]. **Tijdschrift voor diergeneeskunde**, v. 102, n. 5, p. 333–5, 1 mar. 1977.
- ROBINSON, L. A.; JAING, C. J.; PIERCE CAMPBELL, C.; MAGLIOCCO, A.; XIONG, Y.; MAGLIOCCO, G.; THISSEN, J. B.; ANTONIA, S. Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung. **British journal of cancer**, v. 115, n. 4, p. 497–504, 2016.
- ROSEWICK, N. *et al.* Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral microRNAs in B-cell leukemia/lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 6, p. 2306–11, 5 fev. 2013.
- RUIZ, V.; PORTA, N. G.; LOMÓNACO, M.; TRONO, K.; ALVAREZ, I. Bovine Leukemia virus infection in neonatal calves. risk factors and control measures. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, n. OCT, 25 out. 2018.
- SAKURAI, M.; TANEDA, A.; NAGOYA, H.; SEKIKAWA, K. Construction and functional characterization of mutants of the bovine leukaemia virus trans-activator protein p34tax. **Journal of General Virology**, v. 72, n. 10, p. 2527–2531, 1 out. 1991.
- SARID, R.; GAO, S.-J. Viruses and human cancer: from detection to causality. **Cancer letters**, v. 305, n. 2, p. 218–27, 28 jun. 2011.
- SCHWINGEL, D.; ANDREOLLA, A. P.; ERPEN, L. M. S.; FRANDOLOSO, R.; KREUTZ, L. C. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 2949, 27 fev. 2019.
- SIGEL, K.; PITTS, R.; CROTHERS, K. Lung Malignancies in HIV Infection. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 37, n. 2, p. 267–276, 1 abr. 2016.
- SINHA, R.; ROTHMAN, N.; BROWN, E. D.; SALMON, C. P.; KNIZE, M. G.; SWANSON, C. A.; ROSSI, S. C.; MARK, S. D.; LEVANDER, O. A.; FELTON, J. S. High concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo- [4,5-b]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method. **Cancer research**, v. 55, n. 20, p. 4516–9, 15 out. 2000.

SMITH-WARNER, S. A. *et al.* Dietary fat and risk of lung cancer in a pooled analysis of prospective studies. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 11, n. 10 Pt 1, p. 987–92, 1 out. 2002.

SUN, S.; SCHILLER, J. H.; GAZDAR, A. F. **Lung cancer in never smokers - A different disease** *Nature Reviews Cancer*, out. 2007.

TAJIMA, S.; AIDA, Y. The region between amino acids 245 and 265 of the bovine leukemia virus (BLV) tax protein restricts transactivation not only via the BLV enhancer but also via other retrovirus enhancers. **Journal of virology**, v. 74, n. 23, p. 10939–49, dez. 2000.

TAJIMA, S.; TSUKAMOTO, M.; AIDA, Y. Latency of viral expression in vivo is not related to CpG methylation in the U3 region and part of the R region of the long terminal repeat of bovine leukemia virus. **Journal of virology**, v. 77, n. 7, p. 4423–30, abr. 2003.

TANAKA, A. S.; KOMURO, K. Targeted rearrangement of a chromosomal repeat sequence by transfection of a homologous DNA sequence using purified integrase. **Gene Therapy**, v. 12, n. 9, p. 783–794, 17 maio 2005.

THIRY, L.; SPRECHER-GOLDBERGER, S.; JACQUEMIN, P.; COGNIAUX, J.; BURNY, A.; BRUCK, C.; PORTETELLE, D.; CRAN, S.; CLUMECK, N. Bovine leukemia virus-related antigens in lymphocyte cultures infected with AIDS-associated viruses. **Science (New York, N.Y.)**, v. 227, n. 4693, p. 1482–4, 22 mar. 1985.

THORGEIRSSON, T. E. *et al.* A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 638–642, 3 abr. 2008.

TRAVIS, W. D. *et al.* **The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification** *Journal of Thoracic Oncology* Elsevier Inc., 26 set. 2015.

TWIZERE, J. C.; LEFÈBVRE, L.; COLLETE, D.; DEBACQ, C.; URBAIN, P.; HEREMANS, H.; JAUNIAUX, J. C.; BURNY, A.; WILLEMS, L.; KETTMANN, R. The homeobox protein MSX2 interacts with tax oncoproteins and represses their transactivation activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 33, p. 29804–29811, 19 ago. 2005.

VANLEEUEWEN, J. A.; KEEFE, G. P.; TREMBLAY, R.; POWER, C.; WICHTEL, J. J. Seroprevalence of infection with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus in maritime Canada dairy cattle. **The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne**, v. 42, n. 3, p. 193–8, mar. 2001.

WALLIN, M.; EKSTRÖM, M.; GAROFF, H. Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion. **The EMBO journal**, v. 23, n. 1, p. 54–65, 14 jan. 2004.

_____. Receptor-triggered but alkylation-arrested env of murine leukemia virus reveals the transmembrane subunit in a prehairpin conformation. **Journal of virology**, v. 80, n. 19, p. 9921–5, out. 2006.

WATANUKI, S.; TAKESHIMA, S. N.; BORJIGIN, L.; SATO, H.; BAI, L.; MURAKAMI, H.; SATO, R.; ISHIZAKI, H.; MATSUMOTO, Y.; AIDA, Y. Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams. **Veterinary Research**, v. 50, n. 1, 29 nov. 2019.

WILLEMS, L.; GEGONNE, A.; CHEN, G.; BURNY, A.; KETTMANN, R.; GHYSDAEL, J. The bovine leukemia virus p34 is a transactivator protein. **The EMBO journal**, v. 6, n. 11, p. 3385–9, nov. 1987.

XIONG, W.-M.; XU, Q.-P.; LI, X.; XIAO, R.-D.; CAI, L.; HE, F. The association between human papillomavirus infection and lung cancer: a system review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 56,

p. 96419, 10 nov. 2017.

YOUNG, R. P.; HOPKINS, R. J.; CHRISTMAS, T.; BLACK, P. N.; METCALF, P.; GAMBLE, G. D. COPD prevalence is increased in lung cancer, independent of age, sex and smoking history. **European Respiratory Journal**, v. 34, n. 2, p. 380–386, 1 ago. 2008.

ZHAI, K.; DING, J.; SHI, H. Z. **HPV and lung cancer risk: A meta-analysis** **Journal of Clinical Virology** Elsevier B.V., , 1 fev. 2015.

ZYRIANOVA, I. M.; KOVALCHUK, S. N. Bovine leukemia virus tax gene/Tax protein polymorphism and its relation to Enzootic Bovine Leukosis. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 80–87, 1 jan. 2020.