



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

HERBERT CRISÓSTOMO DOS SANTOS ARAÚJO

**INVESTIGAÇÃO DA EMERGÊNCIA DA LEUCOSE BOVINA COMO
POSSÍVEL RISCO À SAÚDE HUMANA: pesquisa por BLV em amostras de
sangue.**

RECIFE-PE

2019

HERBERT CRISÓSTOMO DOS SANTOS ARAÚJO

**INVESTIGAÇÃO DA EMERGÊNCIA DA LEUCOSE BOVINA COMO POSSÍVEL
RISCO À SAÚDE HUMANA: pesquisa por BLV em amostras de sangue.**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas

Coorientador: Dr. André Luiz Santos de Jesus

RECIFE-PE

2019

Catalogação na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Araújo, Herbert Crisóstomo dos Santos

Investigação da emergência da leucose bovina como possível risco à saúde humana : pesquisa por BLV em amostras de sangue / Herbert Crisóstomos dos Santos Araújo. – 2019.

54 f. : il.

Orientador: : Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas

Coorientador: Dr. André Luiz Santos de Jesus. .

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2019.

Inclui referências e apêndices.

1. Virologia. 2. Retroviridae. 3. Leucose Enzoótica Bovina, 3. I. Freitas, Antônio Carlos de (orientador). II. Jesus, André Luiz Santos de (coorientador) III. Título.

579.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-203

HERBERT CRISÓSTOMO DOS SANTOS ARAÚJO

**INVESTIGAÇÃO DA EMERGÊNCIA DA LEUCOSE BOVINA COMO POSSÍVEL
RISCO À SAÚDE HUMANA: pesquisa por BLV em amostras de sangue.**

Aprovado em 12/09/2019

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jacinto Costa da Silva Neto
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Karin Florencio Lins de Paiva Fontes
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Recife-PE

2019

Dedico este trabalho à minha família, origem e base
de toda a minha vida

AGRADECIMENTOS

Nossa ânsia por enumerar, classificar e mensurar encontra grande dificuldade no momento de agradecer aos que participam da nossa trajetória e a enriquecem com generosidade em ensinamentos. Dos agradecimentos pelo amor providencial a mim conferido no seio familiar, que nas pessoas do meu pai, João Crisóstomo de Araújo e da minha mãe, Maria Salete dos Santos Araújo encontram seu maior expoente, me volto a agradecer também a todos que somaram na minha formação pessoal e acadêmica. Não podendo esquecer de Rebeca Dutra, minha melhor surpresa durante esta exigente fase, cujo companheirismo e incentivo têm sido de uma importância indescritível. Incluo nesta minha humilde demonstração de gratidão todos os meus professores, pelo não menos importante papel na minha caminhada de vida e profissão, inclusive ao professor Dr. Mathias Weller pela oportunidade de dar os meus primeiros passos na Biologia Molecular, na Universidade Estadual da Paraíba.

Nesse sentido, meus agradecimentos especiais ao professor Dr. Antônio Carlos de Freitas, que desde a minha primeira solicitação em fazer parte do seu grupo, não mostrou senão extremas gentileza, humildade e sabedoria. A sorte de tê-lo como orientador neste mestrado trouxe junto a convivência com os demais membros do grupo, como André Luiz Santos de Jesus, meu co-orientador, de ajuda decisiva em todas as fases do trabalho, e todos os membros do laboratório, em especial aqueles com quem pude aprender e conviver mais de perto: Anna Jéssica, Alanne Rayssa, Ana Paula Campos, Ana Paula Martins, minhas colegas de PPGIT Daffany e Daniely, Elias Jr., Gabriel Henrique, Hellen, Kamylla Conceição, Karin Fontes, Larissa Macêdo, Lígia Rosa, Marconi Jr., Thiago e todos os membros do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE), não esquecendo Seu Edwards, que pacientemente esperou que eu terminasse os experimentos ao fim do turno para fechar os portões do Laboratório Central.

Teço, ainda, meus agradecimentos a toda a Universidade Federal de Pernambuco, ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica pelo ambiente saudável e rico de conhecimento, em especial aos professores e ao secretário Paulo Brito, sempre prestativo e acessível. Por fim, à CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, a qual foi de grande importância para minha permanência em Recife durante o mestrado.

After sleeping through a hundred million centuries we have finally opened our eyes on a sumptuous planet, sparkling with colour, bountiful with life. Within decades we must close our eyes again. Isn't it a noble, an enlightened way of spending our brief time in the sun, to work at understanding the universe and how we have come to wake up in it?
(Richard Dawkins)

RESUMO

O presente trabalho visa investigar a ocorrência do vírus da leucose bovina (BLV) em pacientes atendidas na rotina ginecológica no Hospital Oswaldo Cruz e no Hospital das Clínicas de Pernambuco. Foram realizados testes de *nested* PCR visando a detecção do DNA proviral nas 34 amostras analisadas; foi usado como controle positivo o DNA proviral extraído de células renais de fetos de carneiro, da linhagem FLK, infectadas com o BLV, utilizando *primers* direcionados ao gene *tax*, do BLV. O objetivo da pesquisa é contribuir para a investigação da emergência do BLV, um retrovírus oncogênico, como possível risco à saúde humana, uma questão atualmente em ascensão no campo da virologia. A investigação do possível risco de infecção pelo BLV em humanos assume importância estratégica, haja vista nossa exposição constante aos produtos da pecuária. Com base nos ensaios moleculares do presente estudo, os resultados não apontam evidência da presença do BLV entre as pacientes estudadas.

Palavras-chave: Retrovírus; Vírus da leucemia bovina; Sangue; Tax; Detecção.

ABSTRACT

The present study aims to investigate the occurrence of *Bovine leukemia virus* (BLV) in patients treated in the gynecological routine at Hospital Oswaldo Cruz and in the Hospital das Clínicas of Pernambuco. Nested PCR tests were performed to detect proviral DNA in the 34 analyzed samples; Proviral DNA extracted from BLV-infected fetus renal sheep cells from the FLV strain was used as a positive control, using primers directed to the BLV tax gene. The aim of the research is to contribute to the investigation of the emergence of BLV, an oncogenic retrovirus, as a possible risk to human health, a rising issue in the field of virology. Investigating the possible risk of BLV infection in humans is of strategic importance due to our constant exposure to livestock products. Based on the molecular assays of the present study, the results show no evidence of BLV presence among the patients studied.

Keywords: Retrovirus; Bovine leukemia virus; *Blood*; *Tax*; Detection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1- | Organização do genoma viral do BLV, adaptado de Gillet <i>et al.</i> , (2007)..... | 18 |
| Figura 2- | Eletroforese realizada em gel de agarose a 2%, a eletroforese das amostras e controles submetidos à PCR com os primers internos para <i>tax</i> (2 ^a etapa da nested PCR)..... | 37 |
| Figura 3- | Teste referente às amostras do grupo A (com aumento de 40% na quantidade de DNA)..... | 38 |
| Figura 4- | Gel representativo de testes realizados para o grupo B de amostras..... | 39 |
| Figura 5- | Teste referente às amostras do grupo B (continuação)..... | 39 |
| Figura 6- | Teste referente às amostras do grupo C..... | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Grupos de amostras testadas, de acordo com a concentração do DNA..... | 32 |
| Tabela 2- Primers utilizados para amplificação de região do gene tax por nested PCR..... | 33 |
| Tabela 3- Mix de reação para as amostras com concentração superior a 30ng/ μ L (grupo A)..... | 34 |
| Tabela 4- Mix de reação de nested PCR aplicado para todas as amostras dos grupos A e B..... | 34 |
| Tabela 5- Mix de reação de nested PCR aplicado para todas as amostras do grupo C..... | 34 |
| Tabela 6- Programa de temperaturas utilizado na primeira etapa da nested PCR..... | 35 |
| Tabela 7- Programa de temperaturas utilizado na segunda etapa da nested PCR..... | 35 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| Item | Definição |
|-------------|---|
| BCR | Receptor de células B |
| BLV | <i>Bovine leukemia vírus</i> |
| DLS | Domínio de ligação do dímero |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| ELISA | Ensaio imunossorbente ligado enzimático |
| HPV | <i>Human papilomavirus</i> |
| HTLV | <i>Human T-lymphotropic vírus</i> |
| LTR | Região longa de repetição terminal |
| mRNA | RNA mensageiro |
| miRNA | microRNA |
| LP | Linfocitose persistente |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| STLV | <i>Simian T-lymphotropic vírus</i> |
| ICTV | <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 15 |
| 2.1 VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (BLV) E SUA DISPERSÃO..... | 15 |
| 2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E REPLICAÇÃO..... | 15 |
| 2.3 MECANISMO DA PATOGÊNESE DA LEUCEMIA BOVINA..... | 21 |
| 2.4 RELAÇÕES EVOLUTIVAS E FUNCIONAIS ENTRE HTLV-1 E BLV..... | 25 |
| 2.5 ASSOCIAÇÃO DA INFECÇÃO POR BLV COM CÂNCERES DE MAMA E PULMÃO..... | 26 |
| 2.6 ESTABELECIMENTO DO BLV NA MAMA E PULMÃO..... | 27 |
| 2.7 SANGUE COMO VIA DE DISSEMINAÇÃO DE RETROVÍRUS (HTLV E BLV)..... | 28 |
| 2.8 METODOLOGIA DE DETECÇÃO DO BLV..... | 29 |
| 3 OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 31 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 31 |
| 3.2.1 Realizar testes de detecção do DNA viral por <i>nested</i> PCR nas amostras oriundas de sangue das pacientes..... | 31 |
| 3.2.2 Discutir as evidências da possível emergência do vírus da leucose bovina como risco à saúde humana..... | 31 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 32 |
| 5 RESULTADOS..... | 37 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 41 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 45 |
| REFERÊNCIAS..... | 46 |

| | |
|--|----|
| APÊNDICES..... | 52 |
| APÊNDICE A – AMOSTRAS TESTADAS NO PRESENTE ESTUDO..... | 52 |
| APENDICE B – GÉIS REPRESENTATIVOS DO TESTE DE PCR PARA GENE DA β-GLOBINA HUMANA (OS ÚLTIMOS QUATRO POÇOS DO GEL REPRESENTATIVO DO GRUPO C NÃO CONTINHAM AMOSTRAS)..... | 54 |

1 INTRODUÇÃO

O vírus da leucose bovina (BLV) é um vírus oncogênico envelopado com cerca de 80-120 µm de diâmetro pertencente à família *Retroviridae* (subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Deltaretrovirus*). Congênere do vírus T-linfotrópico humano (HTLV-I e HTLV-II), o BLV compartilha com o HTLV importantes propriedades biológicas, como uma similaridade genômica superior a 70% e domínios funcionais conservados em suas proteínas. Seu genoma, constituído por um dímero de RNA de fita simples senso positivo, possui tamanho de 8714 nucleotídeos contendo, entre duas regiões de longas repetições terminais idênticas (LTR 5' e LTR 3'), as sequências codificadoras para os genes estruturais (*gag*, *pro*, *pol*, e *env*) seguidas da região reguladora (pX), onde se encontra a região codificadora do gene *tax*, amplamente utilizado para detecção do vírus e alvo dos testes ora realizados.

O BLV é o agente etiológico da leucose enzoótica bovina, uma doença crônica altamente contagiosa entre bovinos que resulta no desenvolvimento de tumores em cerca de 0,5 a 5,5% dos animais infectados com 4 anos ou mais de idade. Animais com leucose ou linfoma são excluídos da produção, acarretando grandes perdas (superiores a \$ 280 milhões anuais) ao mercado agropecuário. Entretanto, como os 95% restantes dos animais infectados permanecem como casos subclínicos de linfocitose persistente, esses animais permanecem na base produtiva da indústria de laticínios e carne.

No contexto das crescentes evidências de infecção do BLV em humanos e a possível associação com tumores na nossa espécie, a emergência da leucose bovina como uma possível zoonose é posta em pauta. A investigação do possível risco do BLV à saúde humana assume, assim, importância estratégica. Nesse sentido, o presente estudo visou investigar, pela realização de *nested* PCR, a ocorrência do vírus da leucose bovina em amostras de sangue de pacientes atendidas na rotina ginecológica no Hospital Oswaldo Cruz e no Hospital das Clínicas Pernambuco.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VÍRUS DA LEUCEMIA BOVINA (BLV) E SUA DISPERSÃO

Os vírus da família *Retroviridae* infectam uma grande gama de organismos, sendo encontrados no genoma de todos os vertebrados dotados de mandíbulas, quais sejam, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (XU et. al, 2018).

Retrovírus são membros da superfamília dos retroelementos (elementos genéticos móveis cuja transposição ocorre via um RNA intermediário), mas se distingue dos demais retrotransposons por sua mobilidade para células ou organismos vizinhos, caracterizando a infecção (KIM et al., 2004). A principal diferença entre os retrovírus e os retrotransposons dotados da região longa de repetição terminal (LTR) é a presença de um gene *env* funcional, uma importante aquisição evolutiva para a proteção, trânsito extracelular e disseminação, dado seu papel crucial para entrada na célula (LERAT; CAPY, 1999; KIM et al., 2004). Sua replicação é caracterizada pela ocorrência da transcrição reversa, a qual gera, a partir do RNA genômico, um DNA que se integra ao genoma hospedeiro e servirá de molde ao RNA mensageiro responsável pela produção das proteínas virais. Uma vez integrado ao genoma do hospedeiro (na condição de provírus), os retrovírus podem ser transmitidos verticalmente como herança genética, um processo chamado de endogenização que ao longo do processo evolutivo adiciona centenas de retrovírus endógenos nos genomas dos vertebrados, ajudando a elucidar sua história evolutiva, sendo raro o registro endógeno entre os *Deltaretrovírus* (FARKAŠOVÁ et al., 2017; WEISS, 1996).

De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), o gênero *Deltaretrovirus*, (família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*), é representado pelo vírus da leucemia bovina (*Bovine leukemia virus*, ou BLV) e outras três espécies, incluindo os vírus T-linfotrópico humano e o vírus T-linfotrópico dos símios. O BLV é um vírus oncogênico frequentemente encontrado no sangue periférico bovino e transmitido horizontalmente via transferência de

células infectadas por contato, leite ou picada de mosquitos (HOPKINS; DIGIACOMO, 1997).

Documentada inicialmente em 1871 por Leisering, a então referida “leucose” foi identificada através de nódulos amarelados no baço de uma vaca e hoje distinguem-se dois tipos de leucose bovina: a leucose enzoótica bovina (LEB, transmissível, sendo seu agente etiológico o BLV) e a leucose bovina esporádica, não transmissível e não associada ao vírus (GILLET et al. 2007).

Os linfócitos infectados transmitem o vírus se transferidos de um animal a outro, sendo as picadas de insetos hematófagos uma via natural de transmissão (FERRER; PIPER, 1978). Há uma prevalência de aproximadamente 30% de linfocitose entre os animais infectados e 0,5 - 5,5% destes, aos 4 anos ou mais de idade, apresentam linfossarcoma (CAMARGOS et al., 2002).

A história de dispersão do BLV é acompanhada por uma diversificação inicialmente descrita como sete genótipos por Rodriguez et al. (2009). De acordo com Camargos et al. (2007), o BLV mostrou-se, no Brasil, principalmente associado com rebanhos leiteiros e apresentou diferentes genótipos, apesar de sua estabilidade genética. A América do Sul apresentava em 2010 os sete genótipos então reconhecidos, detectados no Chile, Argentina, Brasil e Uruguai (MORATORIO et al., 2010). Além dos rebanhos bovinos, o BLV infecta, de acordo com estudos experimentais, outras espécies como caprinos, ovinos, suínos, coelhos, ratos e alpacas (LEE et al., 2012; GILLET et al., 2007).

Em decorrência do comércio de animais reprodutores, o vírus passou por intensa dispersão e se encontra atualmente representado por dez diferentes genótipos, atingindo prevalência superior a 80% em rebanhos de países como Estados Unidos e Canadá além de desregulação imunológica nos animais afetados, alteração na contagem de leucócitos e tumores, sobretudo na subpopulação de células B CD4⁺ (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017).

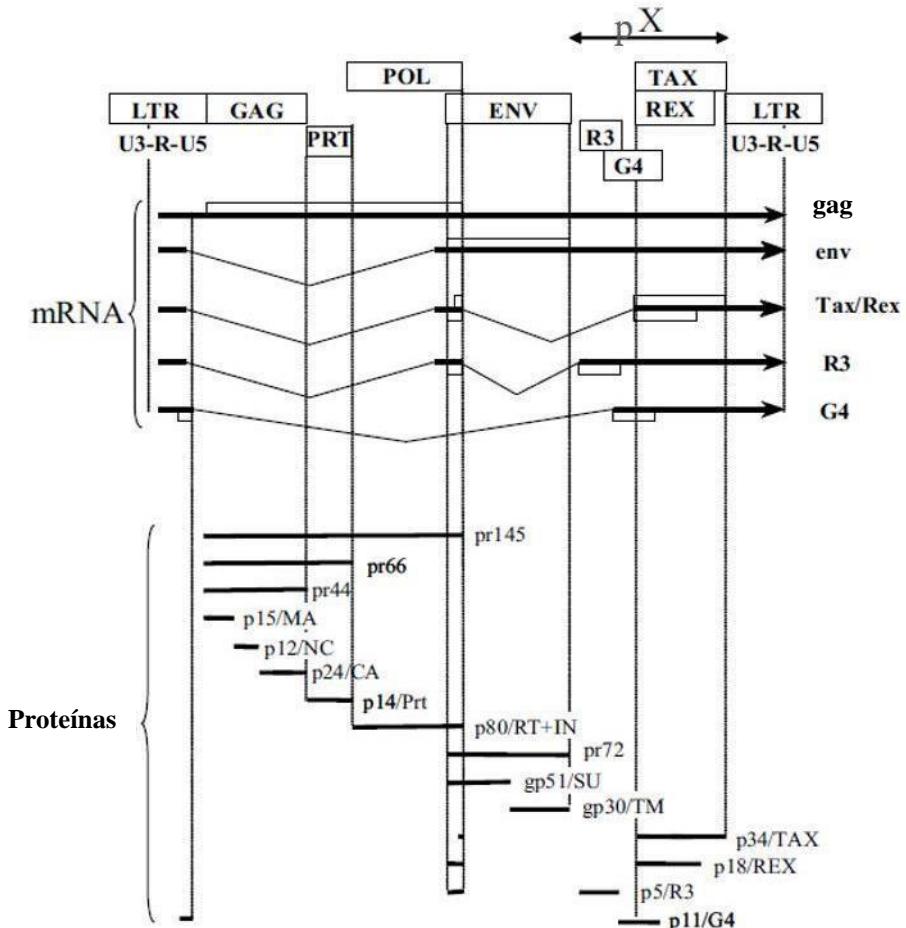
Em diferentes regiões do mundo (com exceção da União Europeia, a qual adotou um bem-sucedido programa de controle), a prevalência do BLV nos rebanhos é de 30-90%, sendo as maiores perdas a morte por linfoma/leucose, queda da produção de leite e restrições comerciais (BAREZ; BROGNIEZ; CARPENTIER, 2015). Na década de 1970, a prevalência do BLV nos rebanhos

dos Estados Unidos e Canadá era em torno de 10%, porém, tais países não consideraram necessário cuidar de sua erradicação. Enquanto 21 países adotaram um programa bem sucedido de erradicação do BLV dos seus rebanhos, a América do Norte apresenta perdas notáveis causadas pelo BLV. Segundo dados de uma década (1996-1997) de estudo do NAHMS (*National Animal Health Monitoring System, USA*), as vacas apresentaram uma queda de produção por animal/ano da ordem de \$ 56 (3% menos leite). Grandes parcelas do gado de corte e leiteiro estão infectadas (39 e 83% respectivamente) de modo que, ao ser o linfossarcoma a principal causa isolada de condenação dos animais de corte (13,5%) e leiteiros (26,9%), o BLV gera perdas anuais estimadas em \$ 285 milhões para os produtores (equivalentes a mais de R\$ 836 milhões em valores atuais) e \$ 240 milhões (> R\$ 704 milhões atualmente) para os consumidores norte-americanos; perdas com casos subclínicos não estimadas (Julianena *et al.*, 2013; BARTLETT *et al.*, 2014).

2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E REPLICAÇÃO

O RNA genômico do BLV possui um tamanho de 8714 nucleotídeos contendo, entre duas regiões de longas repetições terminais (LTRs) idênticas, os genes gag, pro, pol, e env, seguidos da região pX (entre as regiões *env* e LTR 3'), a qual codifica os genes reguladores *tax* e *rex*, além das proteínas acessórias R3 e G4 (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Evolutivamente relacionado com o HTLV-1, o BLV apresenta em relação a ele considerável similaridade em sua sequência genômica, especialmente nas regiões referentes a *gag*, *pol* e à região pX e homologia superior a 70% de suas sequências genômicas completas (SAGATA *et al.*, 1984a).

Figura 1- Organização do genoma viral do BLV, adaptado de Gillet et al., (2007).



A sequência de LTR obtida por Sagata et al. (1984), a partir do provírus integrado ao genoma do hospedeiro apresentou 530 pb com uma sequência do hospedeiro repetida no sítio de integração viral, além de um sítio adjacente a LTR 5' que é complementar à sequência 3' do prolina-tRNA, indicando ser iniciador da transcrição reversa, ao passo que em sentido oposto, partindo de LTR 3' há uma sequência iniciadora da síntese da fita positiva de DNA. LTR inclui as regiões U3, R e U5. A região R do BLV, idêntica à do HTLV, possui extensão de 280pb e constitui a maior parte de LTR (40% da mesma), enquanto as regiões U3 e U5 (211 e 91 pb, respectivamente) são mais curtas do que aquelas do HTLV (SAGATA et al., 1984b).

O gene *gag*, inicia-se na primeira trinca AUG após LTR 5' (base 628) e vai até a posição 1806; codifica para um precursor ($\text{Pr}44^{\text{gag}}$) a ser convertido em 3 proteínas (p15, p24 e p12) envolvidas na formação do capsídeo viral, do qual p24 é a principal, p12 constitui o nucleocapsídeo, o qual é associada com os dois RNAs virais e p15 associa-se ao capsídeo assim como à membrana viral (YOSHINAKA et al., 1986).

Conforme demonstrado por Matthews et al. (1996), p15 corresponde à extremidade N-terminal do precursor codificado por *gag* e constitui um polipeptídio miristilado e fosforilado com 109aa, estruturado em 4 α -hélices que, por interagir com o RNA genômico, capsídeo e membrana, possui importante papel na morfogênese viral, a qual é alterada quando há mutações em sua sequência (MATTHEWS et al., 1996).

A proteína p12, do nucleocapsídeo (NC), apresenta grande afinidade com ácidos nucleicos (MORCOCK et al., 2002). Consiste em uma proteína de 69aa rica em prolina e é requerida para o empacotamento do RNA genômico (KATOH et al., 1993; MORCOCK et al., 2002).

A maior proteína do capsídeo, p24, é o principal alvo da resposta imune do hospedeiro. Maaten & Maaten (1994) demonstraram ser p24 alvo de resposta proliferativa de células T CD4 $^{+}$, apresentando importantes epítópos do resíduo 31 ao 55 e do 141 ao 165 (MAATEN & MAATEN, 1994). Com isso, e pela ocorrência de anticorpos contra p24 nos estágios iniciais da infecção, esta proteína é utilizada para testes de detecção do BLV, embora a maioria dos testes sejam para p51 (BAI et al., 2019).

O precursor p14 (protease viral) possui importante papel na maturação pós-traducional das proteínas de *gag* a partir do precursor $\text{p}44^{\text{gag}}$. A região codificante de p14 localiza-se entre os genes *gag* e *pol*, de modo que sua síntese parte do precursor gag-protease ($\text{p}66^{\text{gag-prt}}$), através da supressão do códon de terminação de *gag* via deslocamento da matriz de leitura por um tRNA lisina-específico (LLAMES et al. 2001).

A tradução do gene *pol* também se dá por deslocamento da matriz de leitura. Sua sequência, cuja extremidade amino-terminal coincide com os últimos 26 códons do gene *pro*, codifica a transcriptase reversa do BLV, uma DNA

polimerase RNA-dependente, segundo Kettmann et al. (1976). Como demonstrado por Kettmann et al. (1976), a transcriptase reversa (RT) do BLV apresenta notável preferência por Mg²⁺ para sua função, com papel fundamental no ciclo de replicação retroviral (KETTMANN et al. 1976).

Ainda por deslocamento da matriz de leitura, ocorre a síntese da poliproteína precursora Gag-Pro-Pol, que além de formar a transcriptase, dá origem também à integrasse viral (PERACH; HIZI, 1999).

A síntese do envelope viral do BLV apresenta algumas particularidades na sua expressão, distribuição e aspectos imunogênicos. Primeiro, por parte de sua sequência estar codificada na extremidade 3' de *pol*; segundo, seu transcrito de 5,1 kb origina a proteína precursora pr72^{env}, a qual é posteriormente clivada nas subunidades SU (gp51) e TM (gp30); finalmente, pr72^{env} não é distribuída de modo disperso nas células, ficando concentrada em uma única célula filha, o que parece evitar o desenvolvimento de uma resposta imune do hospedeiro contra o envelope viral (LLAMES et al. 2001; GILLET et al. 2007).

Uma vez que dificilmente o BLV infecta sozinho uma célula, por uma aparente instabilidade do vírion, é mais comum a transmissão ou infecção pela fusão de proteínas da célula infectada à célula alvo (JOHNSTON et al., 1996; VONÉCHE et al. 1992a). A conformação em folha-β dos resíduos 19-27 de gp51 (porção do envelope glicosilada, externa à membrana) evidencia ter um papel fundamental na fusão da membrana ligando-se a receptores, enquanto gp30 (porção transmembrana) ancora gp51 à membrana. Mutações capazes de alterar o caráter afipático da supracitada região de gp51 inibem a capacidade fusogênica do complexo gp51-gp30. Adicionalmente, anticorpos anti-gp51 inibem a formação do sincício (VONÈCHE et al., 1992b).

De acordo com Sagata et al. (1984), a região pX do BLV apresenta grande homologia com aquela do HTLV-1, o que sugere divergência a partir de um ancestral comum. Os produtos gênicos dessa região (localizada entre env e LTR 3') são gerados por *splicing* do RNA transcrito e possuem importantes funções regulatórias, como a proteína ativadora da transcrição, Tax, de 38 kDa, e Rex, com 18 kDa, reguladora do próprio processamento (*splicing*) de RNA (JENSEN et al. 1991).

Na porção 5' da região pX encontra-se a sequência correspondente à produção de miRNA. A expressão de miRNA em tumores associados ao BLV foi apontada como um possível fator com atribuição causal da tumorigênese pelo vírus, o qual expressa miRNA evolutivamente conservado que mimetiza miRNA oncogênico do hospedeiro (KINCAID et al., 2012). Gillet et al. (2016) demonstraram experimentalmente que o miRNA do BLV é essencial no desenvolvimento de tumores em linfócitos B, além de alterar de modo significativo os padrões de expressão gênica do hospedeiro (GILLET et al., 2016).

As proteínas R3 e G4 foram descobertas como produtos do splicing alternativo do RNA viral; enquanto R3 mostrou função inibidora de Rex, G4 demonstrou melhorar a função de Rex na transativação de LTR (SCHWARTZ; LÉVY, 1994)

A proteína Rex é uma fosfoproteína nuclear de 18 kDa envolvida na regulação pós-transcricional da expressão gênica do BLV. Uma sequência de 250 pb entre o sítio de poliadenilação e sua sequência sinal, na região R de LTR 3' (chamada REE, do inglês Rex responsive element), é necessária à função de produção de proteínas do vírion. Tal função é exercida por Rex do BLV também em HTLV-1 e vice versa, dada a grande homologia entre as regiões REE dos dois vírus (DERSE & MARTARANO, 1990).

Notavelmente, Tajima & Aida (2000), demonstraram ser a transcrição do BLV induzida pela proteína Tax não apenas do próprio BLV, mas também por Tax do HTLV-1, através de sua interação com a região U3 de LTR 5'. Por sua vez, a proteína Rex interage com o elemento responsável a Rex, da região R do BLV e do HTLV-1, aumentando os níveis de transcrito e, por conseguinte, da produção das proteínas estruturais (TAJIMA & AIDA, 2000).

2.3 MECANISMO DA PATOGÊNESE DA LEUCEMIA BOVINA

Desvelar os aspectos patológicos e a carcinogênese no BLV tem sido uma longa trajetória desde sua documentação inicial por Leisering, em 1871. A implicação do vírus como agente etiológico da doença foi estabelecida pelos estudos realizados por Miller et al. (1969), que demonstraram a produção de

partículas virais em linfócitos bovinos com linfocitose persistente. Kettmann et al. (1976), demonstraram que o BLV é um vírus exógeno de RNA possuidor de um complexo com função de transcriptase reversa, permitindo a classificação do mesmo entre os retrovírus oncogênicos (KETTMANN et al. 1976).

Nos animais infectados, foi observado um considerável aumento (70%) da quantidade de linfócitos no sangue em alguns anos após a infecção (LEWIN, 1989). Maior parte da expansão linfocitária mostrou-se, de acordo com Grimoldi et al. (1983), ser decorrente da expansão policlonal de linfócitos B maduros, os quais não apresentavam alterações citológicas nem cariotípicas. De 1 a 5% dos animais infectados por BLV desenvolvem linfossarcoma entre 1 e 8 anos após a infecção e dois terços deles apresentam linfocitose persistente; na maioria dos casos, há expressão do marcador CD5 pelos tumores, os quais afetam especialmente adultos e cujo pico de ocorrência se dá por volta dos 5-8 anos de idade, distinguindo-se da leucemia bovina esporádica, a qual afeta animais com idade inferior a 1 ano e não apresenta associação com o BLV (SCHWARTZ; LÉVY, 1994).

A infectividade e capacidade de transmissão, estão estreitamente relacionadas às proteínas que compõem o envelope, as quais possuem importantes sítios de reconhecimento requeridos para a entrada mediada pela fusão com a membrana celular. A infectividade e patogenicidade são afetadas por mutação no sítio de glicosilação N230 da subunidade superficial do envelope, gp51 ou SU (DE BROGNIEZ et al., 2015). Mutações no envelope podem explicar o surgimento de cepas hiperpatogênicas do vírus, de acordo com De Brogniez et al. (2016).

A ligação das proteínas do envelope viral a receptores da membrana celular é uma via comum de entrada dos vírus nas células e geralmente envolve um receptor com domínio transmembrana (WHITE, 1992). Entretanto, o mecanismo específico de entrada do BLV nas células é pouco detalhado. Ban et al. (1993), descreveram o gene BLVRcpl como provável codificador do receptor de entrada do BLV, uma vez que este gene codifica uma proteína com estrutura semelhante a um receptor e, quando clonado e transfetado em células humanas e murinas, as tornou susceptíveis à infecção por BLV. Por outro lado, embora o gene BLVRcpl tenha sido isolado de diferentes mamíferos, o seu homólogo

humano (hu-BLVRcp) não apresentou atividade de ligação à proteína gp51 do BLV, sendo considerada uma provável explicação para a relativa resistência da espécie humana ao BLV (BAN et al., 1993; BAN et al., 1995).

O receptor de células B (BCR), envolvido no mecanismo apoptótico, parece participar do desenvolvimento de linfocitose persistente. BCR mostrou-se dissociado de CD5 em células B de animais infectados, apesar de haver uma associação física entre CD5 e BCR em células B CD5+ de animais normais. A ausência de CD5 atua inibindo a apoptose desencadeada por BCR e estimula a proliferação de células B. A dissociação entre CD5 e BCR causa queda na taxa de apoptose, o que pode ocasionar linfocitose persistente e a causa da condição de dissociação entre CD5 e BCR, não elucidada, pode ser decorrente da ligação de proteínas virais a esses receptores, de mudanças no ambiente celular e sinalização ou diferenças fenotípicas das linhagens ou estágio desenvolvimental das células (CANTOR et al. 2001; PEREZ-CHACON et al., 2007).

Por outro lado, o papel das proteínas virais para a fusão com a membrana celular e entrada na célula-alvo dispõe de melhor caracterização. O mecanismo de fusão é direcionado pela proteína transmembrana (TM, ou gp30) do complexo do envelope viral, a qual, segundo Vonéche et al. (1992), possui um peptídeo de fusão na sua porção amino-terminal que se insere obliquamente na bicamada lipídica da célula-alvo e mutantes para essa região perderam a capacidade infectiva Willems et al. (1993). Embora o domínio transmembrana possua importante papel na fusão à membrana celular e infectividade, a completa fusão do vírus à membrana parece não ser o único fator para sua entrada, uma vez que alguns mutantes, mesmo incapazes de fazê-la, ainda mantêm capacidade infectiva (WILLEMS et al. 2000).

Lipídios da membrana parecem ter um papel de incremento da capacidade de fusão, a qual envolve também uma mudança conformacional do peptídeo de fusão (hidrofóbico) induzida por baixo pH ou por ligação ao receptor celular (CHARLOTEAUX et al., 2010).

No interior das células infectadas, forma-se um RNA mensageiro subgenômico, contendo apenas alguns trechos do genoma viral, gerado por duplo *splicing* do RNA genômico. Tal mRNA produz duas proteínas com 38 e 18 KDa

(respectivamente, as proteínas Tax e Rex). Tax se liga à região LTR 5' do genoma viral e atua nesta como ativador transcrecional, de modo que sua função é responsável pela replicação viral que resulta, por sua vez, na infecção de múltiplas células; Rex atua na expressão dos genes estruturais do vírus (DERSE, 1987; TAJIMA; AIDA, 2000). O DNA proviral é sintetizado pela ação da transcrição reversa do vírus e se integra em pequeno número (em geral uma a três cópias) no genoma das células infectadas, mantendo baixos níveis de transcrição, dificilmente detectáveis tanto em linfocitose persistente (LP) como em tumores (KETTMANN et al., 1982; TAJIMA; AIDA, 2000).

Adicionalmente, Tax se mostrou capaz de induzir importantes alterações na expressão de genes envolvidos na transdução de sinais, respostas imune e ao stress, além do crescimento celular e apoptose (ARAINGA et al., (2012).

O empacotamento do genoma dos retrovírus no capsídeo é realizado por intermédio da poliproteína Gag, composta pelos domínios MA (p19), CA (p24) e NC (p15 para o HTLV, p12 para o BLV), que irão compor as proteínas do capsídeo viral. Domínios de ligação do dímero (DLS) e o sinal de empacotamento na porção 5' do gene *gag*, estruturas presentes no RNA sem *splicing*, são sítios de reconhecimento para Gag. Em oposição à maioria dos retrovírus, nos quais o reconhecimento do RNA é realizado pelo domínio NC (p15), no BLV o reconhecimento do sinal e inicialização do empacotamento do genoma viral é atribuído à proteína MA (p19), que se liga especificamente ao RNA viral, desencadeando o processo (JEWELL; MANSKY, 2000).

As partículas virais produzidas nas culturas de células infectadas, observadas ao microscópio eletrônico de transmissão, apresentaram diâmetro variável entre 50 e 125 µm, a maioria entre 80 e 110 µm, com uma região central elétron-densa de 60 a 90 µm delimitada por uma membrana (MILLER et al., 1969; STOCK; FERRER, 1971).

A carcinogênese tem sido mais fortemente associada a genes da região pX. Além das fortes evidências da ação carcinogênica do miRNA, demonstra por Gillet et al. (2016), Tax e Rex se mostraram oncogenes capazes de induzir a transformação de fibroblastos de ratos, evidenciando seu potencial papel na oncogênese de etiologia viral (KERKHOFS et al., 1998; WILLEMS et al., 1992).

Em experimentos de transfecção conjunta com Ha-ras, Tax se mostrou capaz de transformar e imortalizar fibroblastos de ratos, conforme Willems et al. (1990). As funções de transativação e transformação pela proteína Tax são determinadas por diferentes porções da proteína, uma vez que podem ser dissociadas por modificações específicas (WILLEMS et al. 1998).

2.4 RELAÇÕES EVOLUTIVAS E FUNCIONAIS ENTRE HTLV-1 E BLV

De acordo com o ICTV, o gênero *Deltaretrovirus* abrange quatro espécies virais: *Bovine leukemia vírus*, *Primate T-lymphotropic virus 1*, *Primate T-lymphotropic virus 2* e *Primate T-lymphotropic virus 3*; cada uma das espécies de vírus T-linfotrópico de primatas inclui uma linhagem que infecta o ser humano (HTLV) e outra que infecta símios (STLV). O gênero possui especial importância pelo potencial carcinogênico de alguns de seus membros, representados pelos vírus da leucemia bovina (BLV), o vírus T-linfotrópico humano (HTLV-1, HTLV-2 e HTLV-3) e seu equivalente nos símios, o STLV-1 (SZCZOTKA et al., 2011). Uma vez que compartilham propriedades biológicas importantes como a capacidade de infectar e transformar células do tecido hematopoiético, tais vírus podem constituir importantes modelos de estudo, especialmente o BLV, uma vez que permite testes com diferentes espécies de hospedeiros (WILLEMS et al. 2000).

Com 70% de homologia entre as sequências genômicas das duas espécies, os estudos de virologia comparada elucidam importantes aspectos evolutivos e funcionais de ambas. No BLV, a região R de LTR é idêntica à do HTLV e constitui a maior parte de LTR (40% da mesma), enquanto as regiões U3 e U5 são mais curtas do que aquelas do HTLV. Tal homologia não é tão amplamente compartilhada com outros retrovírus, indicando que o ramo do BLV e do HTLV divergiu muito antes de vários outros retrovírus tipo C conhecidos (SAGATA et al., 1984b).

Tanto o BLV quanto o HTLV provocam uma patologia linfoproliferativa e uma carcinogênese com notável semelhança, compartilhando características como a ausência de viremia crônica, longo período de latência e ausência de sítios preferenciais de integração nos tumores (SCHWARTZ; LÉVY, 1994).

A partir de análises funcionais das proteínas virais, estudos imunológicos e genéticos, a virologia comparada tem dado suporte a muitas estratégias terapêuticas profiláticas. Tais estratégias incluem vacinas recombinantes, manejo de indivíduos infectados e terapia de ativação gênica, de modo que algumas são vistas como metodologias desenvolvidas para o BLV passíveis de adaptação aos humanos infectados pelo HTLV (RODRÍGUEZ et al. 2011).

2.5 ASSOCIAÇÃO DA INFECÇÃO POR BLV COM CÂNCERES DE MAMA E PULMÃO

A literatura científica tem reportado frequentes evidências de associação entre o vírus e cânceres não apenas em rebanhos, mas também na espécie humana, como discutido por Lawson et al. (2018). Nesse contexto, as pesquisas voltadas para o BLV têm ganhado evidência para além dos interesses econômicos e veterinários, mas também por sua importância como modelo auxiliar na compreensão da biologia do HTLV-1 (patógeno humano a ele aparentado) e da possível emergência do BLV como agente infeccioso na nossa espécie (BAREZ et al., 2015).

Entretanto, tais evidências ainda estão sendo esclarecidas e há alguns estudos em que a pesquisa pelo BLV em seres humanos não detectou o vírus. A título de exemplo, estudo conduzido por Zhang et al. (2017), aplicando PCR em tempo real e imunoensaio enzimático (ELISA) em mais de 200 amostras amostras de sangue de mulheres com ou sem câncer não detectou o BLV entre as mulheres, embora os mesmos testes tenham detectado alta prevalência (50%) do vírus em rebanhos bovinos da mesma região (ZHANG et al., 2017). Na análise de 51 sequências genômicas completas de câncer de mama conduzida por Gillet & Willems (2016), em sequências disponíveis no NCBI (32 bilhões de leituras de sequenciamento recuperadas do banco de dados), não houve mapeamento de nenhuma das diferentes cepas do BLV, o que foi apresentado pelos autores como argumento contra a possível associação entre BLV e o referido câncer em seres humanos (GILLET & WILLEMS 2016).

Por outro lado, a hipótese de infecção pelo BLV em humanos não pode ser formalmente descartada. O pequeno tamanho do genoma retroviral, o qual representa uma pequena fração do DNA da célula infectada, a pequena proporção de células infectadas nas amostras ou o pequeno número de cópias do genoma viral nas células infectadas podem representar dificuldades importantes na detecção do vírus (VINNER *et al.*, 2015).

Considerando que, nos rebanhos, o DNA e proteínas do BLV são mais abundantes no epitélio mamário que em linfócitos, Buehring *et al.* (2014) direcionaram esforços para a detecção em tecidos mamários humanos, conseguindo detectar o vírus na espécie humana por testes de PCR *in situ* e imunohistoquímica. Posteriormente mostrou-se que, na espécie humana, o vírus é detectado com maior frequência em pessoas com câncer. Entre mulheres diagnosticadas com câncer, a frequência de detecção do BLV foi de 59%, enquanto que, entre aquelas sem histórico de câncer de mama, apenas 29% apresentaram, obtendo-se, assim, uma forte associação entre o vírus e casos de câncer de mama (BUEHRING *et al.*, 2015). Resultados semelhantes foram apresentados por Baltzell *et al.* (2018), que encontraram DNA do BLV (PCR *in situ* para o gene *tax*) em maior frequência entre pacientes com câncer e em maior proporção que o HPV. A ocorrência do BLV foi verificada em 34% das amostras ($N = 73$), mas apenas 7% ($n = 14$) para o HPV em um total de 214 amostras de tecidos da mama (BALTZELL *et al.* 2018).

Além disso, a ocorrência do BLV em amostras de câncer de pulmão, juntamente com outros vírus oncogênicos, foi observada por Robinson *et al.*, (2016), embora a detecção tenha mostrado decaimento em função do tempo de congelação das amostras. Adicionalmente, uma incidência de 85% para *Deltaretrovírus*, foi encontrada em amostras de carcinoma de células escamosas de pulmão incluindo o BLV ($n = 8$) em estudo realizado por Kim *et al.*, (2018).

2.6 ESTABELECIMENTO DO BLV NA MAMA E PULMÃO

Uma vez que são recentes os estudos de associação entre o BLV e ocorrência de cancer em seres humanos, muito pouco se tem descrito sobre as

possíveis vias de estabelecimento do vírus em tecidos da mama e pulmão. A dificuldade em investigar as possíveis vias de estabelecimento do BLV nos referidos tecidos é aumentada pelas lacunas, já discutidas neste trabalho, no conhecimento sobre os receptores envolvidos na entrada do vírus na célula.

A transmissão do vírus, embora possa ocorrer pelo sangue em função do seu tropismo pelos linfócitos, não se restringe a essa via de transmissão. Uma demonstração do potencial de transmissão entre bovinos foi dada por Kono *et al.*, (1983), com a transmissão do BLV ocorrendo entre bezerros na ausência de insetos, mesmo após passada a fase de viremia, cujo período ocorreu entre 4 a 12 dias após a inoculação em animais experimentalmente infectados (KONO *et al.*, 1983).

Sabe-se, todavia, que em animais não humanos o vírus se encontra com maior frequência no leite e em tecidos mamários e que pesquisar pelo BLV nesses tecidos mostrou-se uma estratégia exitosa (BUEHRING *et al.*, 2014). O vírus apresentou capacidade infectiva em culturas de células pulmonares humanas induzindo a formação de sincício, sugerindo que tais células possam expresser receptores para o BLV (DIGLIO; FERRER, 1976). Além de células pulmonares humanas, o vírus mostrou-se capaz de se propagar em células de outras espécies de mamíferos, incluindo bovinos, caprinos, símios e morcegos, sugerindo uma ampla gama de potenciais hospedeiros (DIGLIO; FERRER, 1976; GRAVES; FERRER, 1976).

Através do plaqueamento do vírus em células humanas, o BLV apresentou interação com um único receptor em células FLK. De modo semelhante, na infecção e formação de sincício em diversas células humanas, os vírus HTLV-1 e HTLV-2 interagem com um único receptor na superfície celular, compartilhado também pelo STLV e que cujo gene teve localização mapeada no cromossomo 17 da nossa espécie (SOMMERFELT *et al.*, 1988; SOMMERFELT; WEISS, 1990).

2.7 SANGUE COMO VIA DE DISSEMINAÇÃO DE RETROVÍRUS (HTLV E BLV)

A disseminação do HTLV entre seres humanos ocorre tanto horizontal como verticalmente. A via mais eficaz de transmissão do HTLV é através de componentes do sangue contaminados, entretanto, com a adoção de medidas profiláticas tem diminuído a participação desta via e atualmente a transmissão sexual do HTLV é a mais comum, embora possa também ocorrer através da amamentação, conforme Horiguchi *et al.*, (2014).

As semelhanças supracitadas entre o BLV e o HTLV sugerem que, além dos aspectos patológicos, importantes semelhanças morfológicas e funcionais do genoma e proteínas virais podem apresentar importante papel na infecção, incluindo o compartilhamento de receptores e mecanismo de replicação (JEWELL; MANSKY, 2000; SOMMERFELT *et al.*, 1988; SOMMERFELT; WEISS, 1990). Desse modo, é plausível que BLV e HTLV apresentem vias muito semelhantes de disseminação nas populações e estabelecimento nos tecidos infectados.

O plasma sanguíneo não é infectivo para o BLV, em decorrência da ausência de viremia. Por outro lado, a presença de células infectadas pode ocasionar a transmissão do BLV através da exposição e diversos fluidos biológicos contaminados, incluindo sangue (pelas vias subcutânea, endovenosa e intramuscular), leite, sêmen e saliva (BRAGA *et al.*, 1998).

Além da viremia pouco frequente, o BLV pode ser neutralizado por anticorpos dirigidos contra a proteína do envelope gp51, de tal modo partículas virais livres (extracelulares) dificilmente se disseminam através do sangue e por isso a transmissão pela via sanguínea deve ocorrer principalmente pelo contato direto entre células infectadas e não infectadas. Desse modo, a via sanguínea de transmissão se deve provavelmente à transferência não de partículas virais, mas de linfócitos infectados que disseminam o vírus pelo contato célula-célula ou quando transferidos de um indivíduo a outro por transfusão sanguínea ou, especialmente nos rebanhos, através de insetos hematofágicos (BRUCK *et al.*, 1982; FERRER; PIPER, 1978).

2.8 METODOLOGIA DE DETECÇÃO DO BLV

A detecção do BLV tem sido exitosa em pesquisas pelo vírus através de imunohistoquímica, PCR, ELISA e microscopia eletrônica de transmissão. A eficácia dessas metodologias está atrelada às propriedades biológicas do vírus e dos tecidos analisados.

A implicação do BLV como agente etiológico da leucose enzoótica bovina foi fortemente embasada nos estudos de microscopia eletrônica, que permitiram o reconhecimento das partículas virais nas células de animais acometidos pela doença (MILLER *et al.*, 1969; STOCK; FERRER, 1971).

Testes de imunoblotting realizados por Buehring *et al.*, (2003) possibilitaram a detecção de anticorpos reativos para o BLV em seres humanos, fornecendo evidência para a exposição humana ao vírus. A aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR, do Inglês, *polimerase chain reaction*) mostrou-se, juntamente com imunohistoquímica, eficiente em detectar DNA do vírus em tecidos da mama oriundos de amostras humanas em estudo de caso-controle (BUEHRING *et al.*, 2014).

Um estudo realizado com mulheres iranianas incluindo um total de 400 amostras, das quais 200 foram consideradas suspeitas de câncer de mama (170 com lesões malignas, em termos patológicos) investigou a associação entre o BLV e o câncer de mama. Entre as 200 amostras suspeitas de câncer de mama, o estudo detectou os genes *tax* e *gag* a frequências de 30% e 8% respectivamente e a prevalência do vírus em 16,5% das amostras de sangue de mulheres normais. Tal pesquisa, realizada por Khalilian *et al.* (2019), utilizou a técnica de *nested* PCR e as mulheres normais detectadas com o BLV eram de áreas rurais, onde há consumo de produtos não pasteurizados da produção leiteira.

A técnica de *nested* PCR facilita a detecção de DNA em concentrações muito baixas, as quais podem não ser detectáveis apenas com a realização de uma PCR comum, embora parte do mesmo princípio da técnica criada por Kary Mullis (MULLIS, 1990).

A *nested* PCR, por sua vez, parte do mesmo princípio, porém utilizando um par adicional de *primers* que se ligam ao DNA molde (*template*) em sítios localizados no interior do *amplicon* gerado na primeira reação, sendo de grande utilidade na detecção de DNA viral mesmo na ausência de viremia (Botero *et al.*, 2008; Gregory *et al.*, 2011).

Pelo uso de dois diferentes pares de *primers*, com o segundo par anelando dentro da região do DNA amplificada pelo primeiro par, é possível realizar duas PCRs complementares. Assim, é realizada uma amplificação de um produto já amplificado por PCR, o que permite a obtenção de uma amplificação ainda maior da sequência-alvo, sendo, por este motivo, empregada no presente trabalho a *nested* PCR.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência do vírus da leucemia bovina em pacientes atendidas na rotina ginecológica no Hospital Oswaldo Cruz e no Hospital das Clínicas Pernambuco.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Realizar testes de detecção do DNA viral por *nested* PCR nas amostras oriundas de sangue das pacientes;

3.2.2 Discutir as evidências da possível emergência do vírus da leucose bovina como risco à saúde humana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Amostras – Foram analisadas amostras de sangue de 34 mulheres atendidas no serviço de ginecologia do Hospital Oswaldo Cruz e Hospital das Clínicas de Pernambuco, entre o período de janeiro de 2011 a Dezembro de 2016. Tais amostras foram triadas e extraídas para pesquisa anterior do próprio Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE), onde se realizou o presente trabalho. Todas as pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido e este trabalho foi aprovado pelos Comitê de ética e Pesquisa (CAAE: 0058.0.106.000-10, HUOC/PROCAPE 64/2010) e (CEP/CCS/UFPE sob o CAAE: 09307612.8.0000.5208).

O DNA extraído foi encaminhado para a presente pesquisa, a fim de se investigar a possibilidade de ocorrência do vírus da leucemia bovina (BLV) nas mesmas. O DNA foi submetido a espectrofotometria, visando sua quantificação quanto à concentração (em ng/µL) e pureza (dada pela razão de absorbância A₂₆₀/A₂₈₀) do mesmo. As mesmas foram, em seguida, agrupadas de acordo com a faixa de concentração do DNA, visando manter sempre uma massa de DNA acima de 30 ng em cada reação (tabelas 3 a 5).

Tabela 1. Grupos de amostras testadas, de acordo com a concentração do DNA.

| GRUPO | CONCENTRAÇÃO DO DNA | VOL. APLICADO | NÚMERO DE AMOSTRAS |
|-------|---------------------|---------------|--------------------|
| A | 30 a 99 ng/µL | 3 µL | 10 |
| B | 6 a 29 ng/µL | 5 µL | 19 |
| C | ≤ 6 ng/µL | 7 µL | 5 |

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) - A nested PCR foi o método empregado nos testes visando a detecção do DNA proviral nas amostras analisadas. Para certificar a qualidade do protocolo de reação seguido nos testes, o mesmo foi aplicado em amostra de DNA proviral extraído de células renais de

carneiro embrionário, da linhagem FLK, infectadas com o BLV. A extração do DNA das células infectadas foi realizada com o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. O volume de cultura celular utilizado foi de 500 µL.

Os *primers*, baseados no trabalho de Buehring et al. (2014), foram direcionados ao gene *tax* e são mostrados na Tabela 1, com suas respectivas sequências, função na nested PCR, tamanho do *amplicon* gerado por cada par e temperatura de anelamento.

Tabela 2. Primers utilizados para amplificação de região do gene *tax* por nested PCR.

| SEQUÊNCIA DO PRIMER (5'PARA 3') | POSIÇÃO NO GENOMA | FUNÇÃO NA NESTED PCR | TAMANHO DO AMPLICON | TEMPERATUR A DE ANELAMENTO |
|------------------------------------|----------------------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| F: CTTCGGGATCCATTACCTG | 7197–7216 | | | |
| A | | Externo | 373 | 55/55 |
| R: GCTCGAAGGGGGAAAGT | 7570–7551 | | | |
| GAA | | | | |
| F: ATGTCACCATCGATGCCT | 7310–7329 | | | |
| GG | | I | 113 | 55/53 |
| R: CATGGCGGTCCAGTTG | 7423–7404 | | | |
| ATA | | | | |

Os *primers* acima foram empregados na nested PCR para as reações da primeira e segunda etapas. A massa de DNA proviral (*template*) adicionada ao *mix* de reação, de acordo com o grupo de amostras, foi mantida acima de 30 ng, mantido o volume de *template* constante para o grupo testado (tabelas 3 a 5).

Tabela 3. Mix de reação para as amostras com concentração superior a 30ng/µL (grupo A).

| COMPONENTE | VOLUME |
|-----------------------|---------|
| DNA da amostra > 30ng | 3 µL |
| Primer (10µM) farward | 1 µL |
| Primer (10µM) reverse | 1 µL |
| Master Mix (2X) | 12,5 µL |
| H ₂ O | 7,5 µL |
| Total | 25 µL |

Tabela 4. Mix de reação de nested PCR aplicado para todas as amostras dos grupos A e B.

| COMPONENTE | VOLUME |
|-----------------------|---------|
| DNA da amostra > 30ng | 5 µL |
| Primer (10µM) farward | 1 µL |
| Primer (10µM) reverse | 1 µL |
| Master Mix (2X) | 12,5 CL |
| H ₂ O | 5,5 µL |
| Total | 25 µL |

Tabela 5. Mix de reação de nested PCR aplicado para todas as amostras do grupo C.

| COMPONENTE | VOLUME |
|-----------------------|--------|
| DNA da amostra > 30ng | 7 µL |
| Primer (10µM) farward | 1 µL |

| | | |
|------------------|---------|---------|
| Primer (10µM) | reverse | 1 µL |
| Master Mix (2X) | | 12,5 CL |
| H ₂ O | | 3,5 µL |
| Total | | 25 µL |

Tabela 6. Programa de temperaturas utilizado na primeira etapa da nested PCR.

| TEMPERATURA | TEMPO | Nº CICLOS | DE |
|-------------|-------|--------------|----|
| 95 °C | 2' | 1 | |
| 95 °C | 30" | | |
| 55 °C | 30" | 30 | |
| 72 °C | 20" | | |
| 72 °C | 5' | 1 | |

Tabela 7. Programa de temperaturas utilizado na segunda etapa da nested PCR.

| TEMPERATURA | TEMPO | Nº CICLOS | DE |
|-------------|-------|--------------|----|
| 95 °C | 2' | 1 | |
| 95 °C | 30" | | |
| 60 °C | 30" | 30 | |
| 72 °C | 20" | | |
| 72 °C | 5' | 1 | |

Análise por eletroforese - A eletroforese dos produtos da PCR ocorreu em gel de agarose a 2%, com revelação do gel à luz ultravioleta, utilizando brometo de etídio como corante fluorescente para o DNA.

5 RESULTADOS

Como controle positivo, foi utilizado o DNA extraído de células renais de carneiro embrionário (linhagem FLK) previamente infectadas com BLV. A concentração do DNA obtido na extração foi de 4 ng/µL, sendo inicialmente utilizados 12 ng (volume de 3 µL) do mesmo como template para o teste inicial na primeira etapa da *nested* PCR, conforme descrito em “material e métodos”.

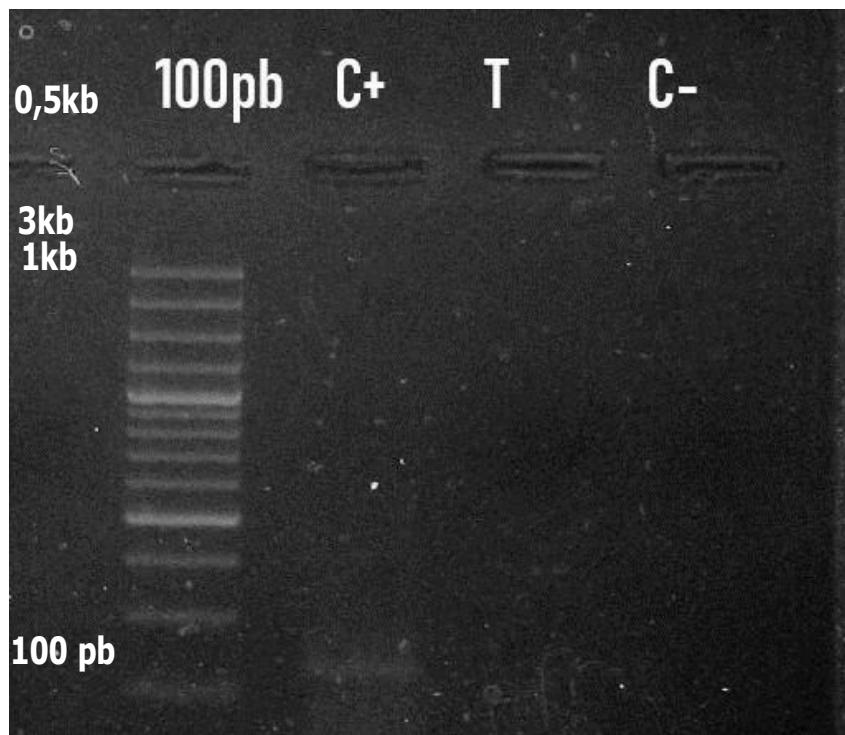


Figura 2. Eletroforese das amostras e controles submetidos à PCR com os *primers* internos para *tax* (2^a etapa da nested PCR). Amostra de DNA extraído de células infectadas (C+) apresentou amplificação, confirmando o funcionamento da PCR. Amostra teste (T) não mostrou amplificação. Controle negativo (C-), não mostrou amplificação. Todas as eletroforeses foram realizadas em gel de agarose a 2%.

Testes para detecção de BLV nas amostras do grupo A - Nos primeiros testes (Tabela 3) feitos para as amostras do grupo A, não houve amplificação.

Dada a grande variação de concentração do DNA entre as amostras, foram realizados testes com maiores quantidades de DNA adicionadas ao *mix* da primeira etapa da *nested PCR*. Tal aumento na quantidade de DNA *template* visou evitar a ocorrência de falsos negativos, caso a não detecção estivesse sendo ocasionada por quantidade insuficiente de DNA nas amostras. Entretanto, o aumento da massa de DNA incluída nos testes não resultou em detecção nos testes com 3 ou 5 μ L no grupo A. Assim, os testes das amostras do grupo A não mostraram relação entre os resultados negativos e baixa quantidade de DNA, bem como não forneceram evidência da presença do vírus nas amostras testadas (Figura 4).

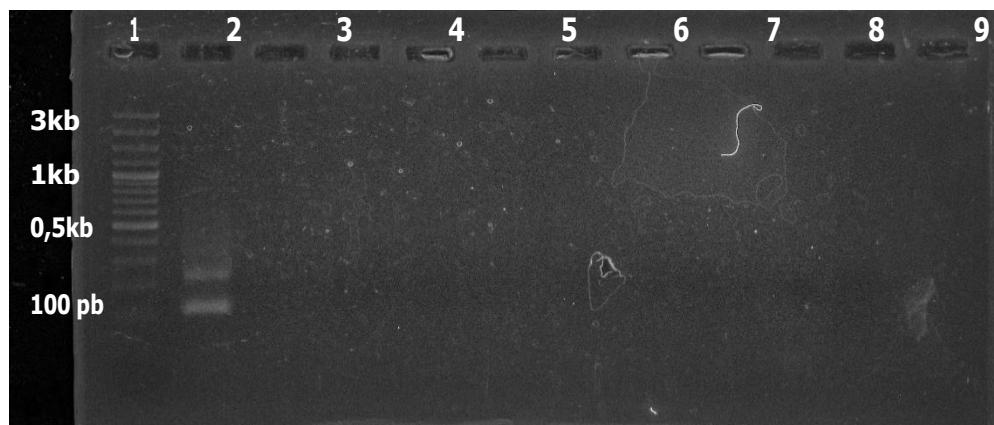


Figura 3. Teste referente às amostras do grupo A (com aumento de 40% na quantidade inicial de DNA). Poço 1: marcador de tamanho molecular. Poço 2: controle positivo. Poço 3: controle negativo. Poços 4 a 12: amostras. Não houve detecção de DNA do BLV em nenhuma das amostras.

Testes para detecção de BLV nas amostras do grupo B - As amostras do grupo B apresentavam, todas, concentração do DNA abaixo de 30ng/ μ L (menor concentração: 10 μ L). Desse modo, todas foram adicionadas ao mix em um volume de 5 μ L na primeira etapa da reação, a fim de que ficassem todas com um total superior a 30 ng de DNA. Não houve detecção do BLV em nenhuma das amostras do grupo (figura B).

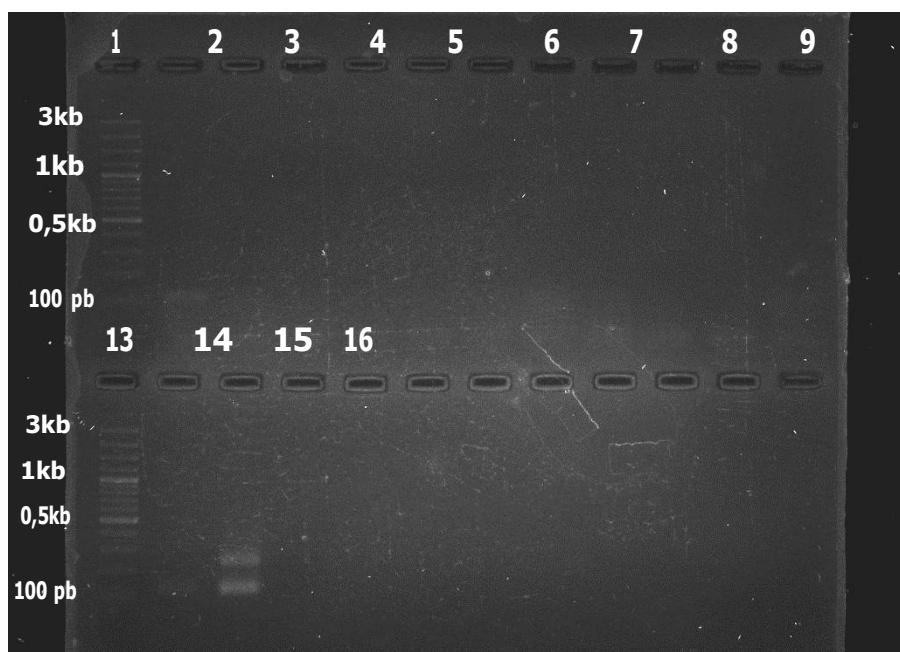


Figura 4. Gel representativo de testes realizados para o grupo B de amostras. Poços 1 e 13: marcador de tamanho molecular. Poço 2: controle positivo. Poço 3: controle negativo. Poços 4 a 12: amostras do grupo B (houve detecção em nenhuma das amostras do grupo B). Poços 14 e 15: controle positivo adicionado a amostras do grupo B, para checar possível interferência do material das amostras na reação (ocorreu amplificação do controle positivo mesmo este representando apenas 30% (12ng) do DNA presente no mix de reação).

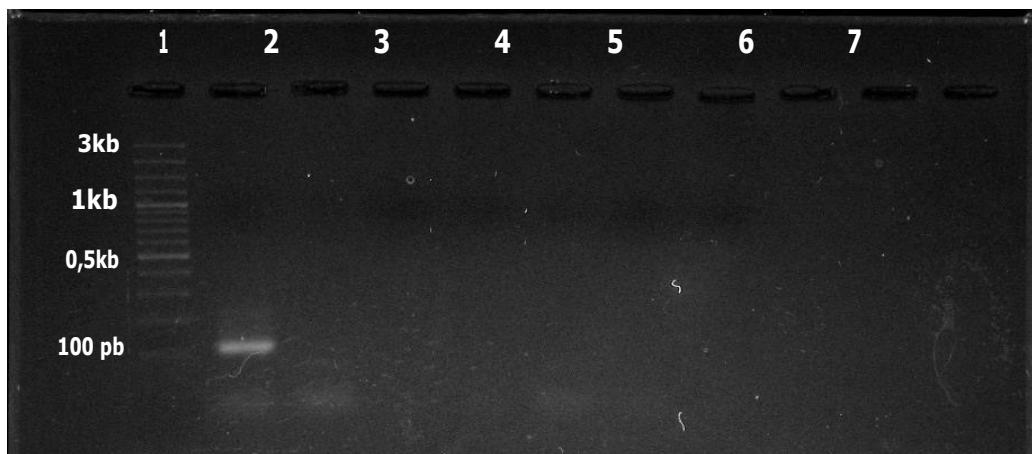


Figura 5. Teste referente às amostras do grupo B (continuação). Poço 1: marcador de tamanho molecular. Poço 2: controle positivo. Poço 3: controle negativo. Poços 4 a 10: amostras. Não houve detecção.

Testes para detecção de BLV nas amostras do grupo C - Não houve detecção de DNA do BLV nas amostras do grupo C. A amplificação do controle positivo, a não amplificação do controle negativo e não detecção nas amostras do grupo C, mesmo com a aplicação de um volume de 7 µL das mesmas ao mix de reação, confirmaram que, mesmo com a reação ocorrendo normalmente, não foi encontrado DNA do BLV nas amostras analisadas. Não encontrou-se evidência concreta da ocorrência do BLV no presente estudo.

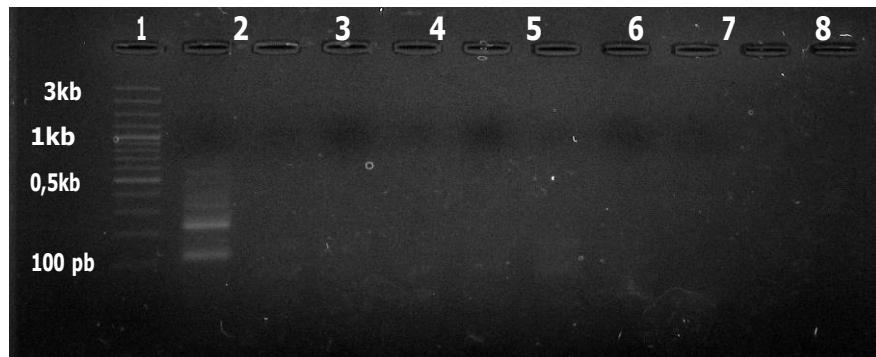


Figura 6. Teste referente às amostras do grupo C. Poço 1: marcador de tamanho molecular. Poço 2: controle positivo. Poço 3: controle negativo. Poços 4 a 9: amostras. Não houve amplificação em nenhuma das amostras. Amplificação do controle positivo demonstrou funcionamento da nested PCR.

6 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados foram obtidos a partir de amostras íntegras e correto funcionamento da *nested* PCR. Uma vez que as amostras utilizadas foram testadas também para o gene da β-globina, a fim de assegurar a integridade do DNA extraído. Tal integridade foi confirmada pela amplificação nas PCRs para o gene da β-globina realizadas em todos os grupos (ver Apêndice I). Nos testes direcionados à amplificação do controle positivo, mesmo em baixa quantidade (apenas 12ng), demonstrou o correto funcionamento da *nested* PCR. Uma vez que o tamanho da banda coincide com o esperado e que, nos testes preliminares com controle positivo, a primeira etapa da *nested* PCR não gerou banda, pode-se descartar a hipótese de que o DNA visualizado no controle positivo fosse o próprio DNA adicionado ao *mix*, o que torna inequívoca a amplificação apenas do controle positivo. Não obstante, o gene alvo da presente pesquisa (*tax*) fornece uma boa região para testes de detecção do BLV. Tal situação foi, a título de exemplo, demonstrada por Buehring et al. (2019), haja vista a detecção, em amostras de sangue, para *gag* (13%) ter sido menor que aquela para *tax* (22%), (BUEHRING et al., 2019).

Com a *nested* PCR funcionando normalmente, a ausência de bandas em todas as amostras não forneceu evidência consistente da presença do BLV no sangue das pacientes envolvidas no estudo.

Tais dados não descartam de modo definitivo a possibilidade de haver a presença do vírus. Mesmo havendo DNA integrado ao genoma do hospedeiro, os testes podem não detectá-lo em amostras clínicas por diversas razões. Por exemplo, com o pequeno tamanho do genoma retroviral, o mesmo representa uma pequena fração do DNA da célula infectada; segundo, o tipo de célula infectada pode representar apenas uma pequena parcela da amostra; adicionalmente, as células infectadas podem apresentar uma pequena quantidade de cópias do genoma viral, a exemplo do HIV e do HTLV-1 (relacionado ao BLV) encontrados como cópias únicas em uma pequena fração das células nucleadas do sangue. Some-se a isto o fato de que a viremia dificilmente é observada no BLV, o que faz do sangue um tecido com menores possibilidades de detecção em

comparação com a mama (BRUCK et al., 1982; FERRER; PIPER, 1978; VINNER et al. 2015).

Um fator importante a ser considerado é a condição clínica das pacientes estudadas. Embora o BLV esteja associado a linforssarcoma em bovinos, os estudos com seres humanos têm associado o vírus principalmente ao câncer de mama e, em menor grau, pulmão (KIM et al., 2018; LAWSON et al., 2018). Uma vez que as pacientes do presente estudo não possuíam diagnóstico de tais enfermidades, era esperado que a ocorrência do BLV fosse inconstante ou ausente. A recente detecção do BLV em sangue de mulheres iranianas publicada por Khalilian et al. (2019), estava associada a tecidos suspeitos de câncer de mama ou a mulheres normais de regiões rurais, expostas ao consumo de leite não pasteurizado ou seus produtos. Todavia, se faz importante a investigação na parcela populacional envolvida no nosso trabalho e em amostras de sangue. Uma das razões é que, dado o maior direcionamento das pesquisas voltadas para associação entre BLV e câncer de mama, pouco se sabe da prevalência do vírus em relação a outras neoplasias ou em outros tecidos. Ainda, os resultados aqui apresentados se inserem no contexto da investigação dos potenciais riscos, ainda não esclarecidos, decorrentes da infecção pelo BLV em nossa espécie. Tais resultados assumem um papel de ampliação das frentes de investigação que visam avaliar a problemática de uma possível emergência da leucose enzoótica bovina como potencial zoonose. Estudos semelhantes estão sendo realizados no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental no que tange à associação do BLV com câncer de mama e pulmão na população pernambucana, de modo que os dados obtidos através das amostras de sangue assumem função complementar na abordagem da problemática em questão.

A infecção pelo BLV segue sob debate, dada a dificuldade de sua detecção e lacunas no conhecimento dos seus mecanismos infectivo e carcinogênico, ainda menos claros em humanos. Zhang et al. (2017), não detectaram o BLV por PCR em tempo real nem imunoensaio (ELISA) em amostras de sangue de mulheres com ou sem câncer, ainda que os mesmos testes tenham detectado alta prevalência (50%) do vírus em rebanhos bovinos da mesma região da China. Deste modo, o estudo, que contou com mais de 200 amostras, não encontrou evidências de infecção do BLV em humanos. De modo

semelhante, a análise de 51 sequências genômicas completas de câncer de mama conduzida por Gillet & Willems (2016), mostrou serem os tumores desprovidos de DNA do BLV. Após extensiva busca por BLV nas sequências disponíveis no NCBI (32 bilhões de leituras de sequenciamento recuperadas do banco de dados), não houve mapeamento de nenhuma das diferentes cepas do BLV, o que representa, segundo os autores, um forte argumento contra a possível associação entre BLV e o referido câncer em seres humanos (GILLET & WILLEMS 2016).

Convém reiterar, ainda, que a detecção de DNA retroviral integrado nas células requer métodos capazes de detectar a presença do vírus mesmo em baixas quantidades. Os *primers* utilizados no presente estudo, foram previamente validados pela pesquisa de Buehring et al. (2014), cujo estudo detectou genoma do BLV em tecido mamário. Dada a baixa proporção de DNA retroviral integrado no genoma das células infectadas, pode-se levantar a hipótese de que a não detecção do BLV nas amostras do presente estudo se deva à quantidade insuficiente de DNA nas mesmas. Entretanto, as amostras apresentaram em seus testes, em sua maioria, massa de DNA superior a 50ng, quantidade utilizada por Schwingel et al. (2019) para o mesmo volume de PCR (25 µL) a partir de tecido mamário em estudo que encontrou associação positiva entre BLV e câncer de mama. Além disso, a quantidade de DNA das células FLK infectadas com BLV (controle positivo dos testes ora apresentados) mostraram amplificação mesmo a partir de 12ng de DNA, o que representa uma dificuldade à suposição de que a baixa quantidade de DNA tenha sido responsável pela falta de detecção do BLV no presente estudo.

A associação recorrente em diferentes trabalhos entre BLV e câncer na espécie humana, como apontado por Lawson et al. (2018), embora crescente, ainda permanece como uma questão sob investigação. Por sua importância como modelo auxiliar na compreensão da biologia do HTLV-1 (patógeno humano a ele aparentado) e da possível emergência do BLV como agente infeccioso na nossa espécie, as pesquisas sobre o BLV em seres humanos possuem importante papel para a heurística da biologia da infecção e na adoção de estratégias visando a profilaxia e a terapêutica. À luz do conhecimento atual sobre o BLV e o HTLV, as medidas adotadas no controle da infecção de uma espécie podem ser adaptadas

ou gerar conhecimento para controle de sua congênere (BAREZ *et al.*, 2015; RODRÍGUEZ *et al.*, 2011; SCHWARTZ; LÉVY, 1994)

Uma vez que sua infecção foi observada em caprinos, suíños, coelhos, ratos e alpacas, o BLV parece possuir uma gama de potenciais hospedeiros, embora seu potencial oncogênico pareça limitado em outras espécies, sendo consistentemente observada apenas em bovinos e ovinos (LEE *et al.*, 2012; GILLET *et al.*, 2007).

Adicionalmente, o estreito parentesco entre BLV e HTLV-1, incluindo o compartilhamento de grandes porções do genoma, o tropismo por linfócitos ocasionando doença linfoproliferativa, a ausência de viremia crônica, longo período de latência, ausência de sítios preferenciais de integração nos tumores e a capacidade de ter a transcrição ativada por proteínas da outra espécie, tornam o BLV um importante modelo para compreensão da biologia do gênero *Deltaretrovirus*. Tais semelhanças são enfatizadas na busca por estratégias profiláticas e terapêuticas, através da elaboração de modelos baseados nas propriedades biológicas conhecidas de tais espécies, por meio da abordagem da virologia comparada (BAREZ *et al.*, 2015; RODRÍGUEZ *et al.*, 2011).

No contexto das frequentes evidências de infecção do BLV em humanos e a proposta de associação com tumores na nossa espécie, a emergência da leucemia bovina como uma possível zoonose é posta em pauta. A investigação do possível risco do BLV à saúde humana assume, assim, importância estratégica, haja vista nossa exposição constante aos produtos da pecuária, especialmente carne e laticínios (BUEHRING *et al.*, 2015).

Os resultados apresentados não evidenciaram a ocorrência do BLV entre as mulheres estudadas. Os mesmos refletem a condição de uma amostra da população feminina normal, uma vez que as mulheres participantes da pesquisa não eram portadoras de câncer, mas sim pacientes atendidas na rotina ginecológica do Hospital Oswaldo Cruz e Hospital das Clínicas de Pernambuco. Diante do contexto em que se insere o estudo e com os testes funcionando normalmente, conclui-se, dos resultados apresentados, que não houve detecção do BLV. As pacientes, não apresentando relato de câncer, também não apresentaram DNA do BLV nas amostras analisadas.

7 CONCLUSÕES

Os testes realizados no presente estudo não detectaram a presença do BLV nas amostras analisadas, o que pode refletir a condição da população normal, não portadora de câncer.

Dentro do grupo de pacientes estudado, o sangue não evidenciou infecção pelo BLV.

REFERÊNCIAS

- 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, 2012.
- BAI, L.; YOKOYAMA, K.; WATANUKI, S.; et al. Development of a new recombinant p24 ELISA system for diagnosis of bovine leukemia virus in serum and milk. **Archives of Virology**, v. 164, n. 1, p. 201–211, 2019. Springer Vienna. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00705-018-4058-5>>..
- BALTZELL, K. A.; SHEN, H. M.; KRISHNAMURTHY, S.; SISON, J. D. Bovine Leukemia Virus Linked to Breast Cancer But Not Coinfection With Human Papillomavirus: Case-Control Study of Women in Texas. , 2018.
- BAN, J., HLAVATY, J., ORLIK, O., TSCHACHLER, E., & ALTANER, C. IDENTIFICATION OF A NOVEL HUMAN GENE HOMOLOGOUS TO THE BOVINE LEUKEMIA VIRUS CELL RECEPTOR. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 121, n. 1, p. 5030, 1995.
- BAN, J.; PORTETELLE, D.; ALTANER, C.; et al. Isolation and characterization of a 2.3-kilobase-pair cDNA fragment encoding the binding domain of the bovine leukemia virus cell receptor. **Journal of Virology**, v. 67, n. 2, p. 1050–1057, 1993.
- BAREZ, P. Y.; DE BROGNIEZ, A.; CARPENTIER, A.; et al. Recent advances in BLV research. **Viruses**, v. 7, n. 11, p. 6080–6088, 2015.
- BARTLETT, P. C.; SORDILLO, L. M.; BYREM, T. M.; et al. Options for the control of leukemia virus in dairy cattle. **Javma**, v. 244, n. 8, p. 914–922, 2014.
- BOTERO, J. E.; VIDAL2, C.; CONTRERAS, A.; PARRA, B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, p. 239–244, 2008.
- BRAGA, F. M.; VAN DER LAAN, C. W.; SCHUCH, L. F.; HALFEN, D. C. Infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina(BLV). **Ciência Rural**, 1998.
- BRUCK, C.; PORTETELLE, D.; BURNY, A.; ZAVADA, J. Topographical analysis by monoclonal antibodies of BLV-gp51 epitopes involved in viral functions. **Virology**, v. 122, n. 2, p. 353–362, 1982.
- BUEHRING, G. C.; DELANEY, A.; SHEN, H.; et al. Bovine leukemia virus discovered in human blood. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019. BMC Infectious Diseases.
- 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, 2003.
- BUEHRING, G. C.; SHEN, H. M.; JENSEN, H. M.; et al. Bovine Leukemia Virus DNA in Human Breast Tissue. , v. 20, n. 5, 2014.
- BUEHRING, G. C.; SHEN, H. M.; JENSEN, H. M.; et al. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2015.

- CAMARGOS, M. F.; PEREDA, A.; STANCEK, D.; et al. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine Leukemia Virus. **Virus Genes**, v. 34, n. 3, p. 343–350, 2007.
- CAMARGOS, M. F.; STANCEK, D.; ROCHA, M. A.; et al. Partial sequencing of env gene of bovine leukaemia virus from Brazilian samples and phylogenetic analysis. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 49, n. 7, p. 325–331, 2002.
- CANTOR, G. H.; PRITCHARD, S. M.; DEQUIEDT, F.; et al. CD5 Is Dissociated from the B-Cell Receptor in B Cells from Bovine Leukemia Virus-Infected, Persistently Lymphocytotic Cattle: Consequences to B-Cell Receptor-Mediated Apoptosis. , v. 75, n. 4, p. 1689–1696, 2001.
- CHARLOTEAUX, B.; LORIN, A.; BRASSEUR, R.; LINS, L. The Tilted Peptide Theory; Links Membrane Insertion Properties and Fusogenicity of Viral Fusion Peptides. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 7, p. 718–725, 2010.
- DERSE, D. Bovine leukemia virus transcription is controlled by a virus-encoded trans-acting factor and by cis-acting response elements. **Journal of virology**, v. 61, n. 8, p. 2462–71, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3037109>> <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC255671/>>..
- DIGLIO, C. A.; FERRER, J. F. Induction of Syncytia by the Bovine C-type Leukemia Virus. **Cancer Research**, v. 36, n. 3, p. 1056–1067, 1976.
- FARKAŠOVÁ, H.; HRON, T.; PAČES, J.; et al. Discovery of an endogenous Deltaretrovirus in the genome of long-fingered bats (Chiroptera: Miniopteridae). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 12, p. 3145–3150, 2017.
- FERRER, J. F.; PIPER, C. E. An evaluation of the role of milk in the natural transmission of BLV. **Annales de Recherches Veterinaires**, v. 9, n. 4, p. 803–807, 1978.
- GILLET, N. A.; WILLEMS, L. Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. **Retrovirology**, v. 13, n. 1, p. 1–7, 2016. BioMed Central.
- GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUS, M.; et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, v. 4, p. 1–32, 2007.
- 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. November, p. 4152–4159, 1976.
- GREGORY, L.; HASEGAWA, M. Y.; CASTRO, R. S.; et al. Detecção do vírus da artrite encefalite caprina no sêmen através das técnicas de PCR e NESTED-PCR. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 599–603, 2011.
- HOPKINS, S. G.; DIGIACOMO, R. F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 13, n. 1, p. 107–128, 1997. Elsevier Masson SAS. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30367-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30367-4)>..

- HORIGUCHI, C. L. F.; DAMÁSIO, M. A. DE S.; BASTOS, R. H. C.; et al. HTLV-1/2 transmission in family groups: possible routes of contamination. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 24, n. Supl 6, p. 33–39, 2014.
- JEWELL, N. A.; MANSKY, L. M. In the beginning: Genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 8, p. 1889–1899, 2000.
- JOHNSTON, E. R.; POWERS, M. A.; KIDD, L. C.; RADKE, K. Peripheral blood mononuclear cells from sheep infected with a variant of bovine leukemia virus synthesize envelope glycoproteins but fail to induce syncytia in culture. **Journal of Virology**, v. 70, n. 9, p. 6296–6303, 1996.
- JULIARENA, M. A.; LENDEZ, P. A.; GUTIERREZ, S. E.; et al. Partial molecular characterization of different proviral strains of bovine leukemia virus. **Archives of Virology**, v. 158, n. 1, p. 63–70, 2013.
- KATOH, I.; YOSHINAKA, Y.; YASUNAGA, T. Bovine leukemia virus RNA sequences involved in dimerization and specific gag protein binding: Close relation to the packaging sites of avian, murine, and human retroviruses. **Journal of Virology**, v. 67, n. 4, p. 1830–1839, 1993.
- KETTMANN, R.; DESCHAMPS, J.; CLEUTER, Y. Leukemogenesis by bovine leukemia virus: Proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 8 I, p. 2465–2469, 1982.
- KETTMANN, R.; PORTETELLE, D.; MAMMERICKX, M.; et al. 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, 1976.
- KHALILIAN, M.; HOSSEINI, S. M.; MADADGAR, O. Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women. **Microbial Pathogenesis**, v. 135, n. May, p. 103566, 2019. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103566>>..
- KIM, F. J.; BATTINI, J. L.; MANEL, N.; SITBON, M. Emergence of vertebrate retroviruses and envelope capture. **Virology**, v. 318, n. 1, p. 183–191, 2004.
- 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. 1–13, 2018. BMC Cancer.
- KONO Y, SENTSUI H, ARAI K, ISHIDA H, I. W. NII-Electronic Library Service. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 45, n. 6, p. 799- 802., 1983. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb1993/17/11/17_11_1460/_pdf/-char/ja>..
- LAWSON, J. S.; SALMONS, B.; GLENN, W. K. Oncogenic viruses and breast cancer: Mouse mammary tumor virus (MMTV), bovine leukemia virus (BLV), human papilloma virus (HPV), and Epstein-Barr virus (EBV). **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. JAN, 2018.
- LEE, L. C.; SCARRATT, W. K.; BUEHRING, G. C.; SAUNDERS, G. K. Bovine leukemia virus infection in a juvenile alpaca with multicentric lymphoma. **Canadian**

- Veterinary Journal**, v. 53, n. 3, p. 283–286, 2012.
- LERAT, E.; CAPY, P. Retrotransposons and retroviruses: Analysis of the envelope gene. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 9, p. 1198–1207, 1999.
- LLAMES, L.; GOYACHE, J.; DOMENECH, A.; et al. Cellular distribution of bovine leukemia virus proteins gp51SU, Pr72env, and Pr66gag-pro in persistently infected cells. **Virus Research**, v. 79, n. 1–2, p. 47–57, 2001.
- MAATEN, V. DER; MAATEN, V. DER. T cell proliferative response to bovine leukaemia virus (BLV): identification of T cell epitopes on the major core protein (p24) in BLV-infected cattle with normal haematological values. , p. 2223–2231, 1994.
- MATTHEWS, S.; MIKHAILOV, M.; BURNY, A.; ROY, P. The solution structure of the bovine leukaemia virus matrix protein and similarity with lentiviral matrix proteins. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 13, p. 3267–3274, 1996.
- MILLER, J. M.; MILLER, L. D.; OLSON, C.; GLLLETIE, K. G. Virus-Like Particles in Phytohemagglutinin- Stimulated Lymphocyte Cultures With. , p. 1297–1305, 1969.
- MORATORIO, G.; OBAL, G.; DUBRA, A.; et al. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. **Archives of Virology**, v. 155, n. 4, p. 481–489, 2010.
- MORCOCK, D. R.; KATAKAM, S.; KANE, B. P.; CASAS-FINET, J. R. Fluorescence and nucleic acid binding properties of bovine leukemia virus nucleocapsid protein. **Biophysical Chemistry**, v. 97, n. 2–3, p. 203–212, 2002.
- MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56–65, 1990.
- NEALE D. STOCK AND JORGE F. FERRER. Replicating C-Type Virus in Phytohemag- glutinin-Treated Buffy-Coat Cultures of. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 48, n. 4, p. 985–996, 1971.
- PERACH, M.; HIZI, A. Catalytic features of the recombinant reverse transcriptase of bovine leukemia virus expressed in bacteria. **Virology**, v. 259, n. 1, p. 176–189, 1999.
- PEREZ-CHACON, G.; VARGAS, J.; JORDA, J.; et al. CD5 does not regulate the signaling triggered through BCR in B cells from a subset of B-CLL patients. **Leukemia and Lymphoma**, v. 48, n. 1, p. 147–157, 2007.
- POLAT, M.; TAKESHIMA, S. N.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology Journal**, 2. nov. 2017. BioMed Central Ltd.
- ROBINSON, L. A.; JAING, C. J.; PIERCE CAMPBELL, C.; et al. 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. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2016.213>> .
- RODRIGUEZ, S. M., GOLEMBA, M. D., CAMPOS, R. H., TRONO, K., & J. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 11, p. 2788–2797, 2009.

- RODRÍGUEZ, S. M.; FLORINS, A.; GILLET, N.; et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLV. *Viruses*, v. 3, n. 7, p. 1210–1248, 2011.
- SAGATA, N.; YASUNAGA, T.; OGAWA, Y.; TSUZUKU-KAWAMURA, J.; IKAWA, Y. Bovine leukemia virus: Unique structural features of its long terminal repeats and its evolutionary relationship to human T-cell leukemia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 81, n. 15 I, p. 4741–4745, 1984.
- SAGATA, N.; YASUNAGA, T.; OHISHI, K.; et al. Comparison of the entire genomes of bovine leukemia virus and human T-cell leukemia virus and characterization of their unidentified open reading frames. *The EMBO Journal*, v. 3, n. 13, p. 3231–3237, 1984.
- SCHWARTZ, I.; LÉVY, D. Pathobiology of bovine leukemia virus. *Veterinary research*, 1994.
- 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. 1–7, 2019. Springer US. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-39834-7>>..
- SOMMERFELT, M. A.; WEISS, R. A. Receptor interference groups of 20 retroviruses plating on human cells. *Virology*, v. 176, n. 1, p. 58–69, 1990.
- SOMMERFELT, M. A.; WILLIAMS, B. P.; CLAPHAM, P. R.; et al. Human T cell leukemia viruses use a receptor determined by human chromosome 17. *Science*, v. 242, n. 4885, p. 1557–1559, 1988.
- SZCZOTKA, M.; KUŽMAK, J.; KOSTRO, K.; IWAN, E. Telomerase activity in cattle infected with bovine leukaemia virus. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v. 55, n. 4, p. 587–592, 2011.
- 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. 10939–10949, 2000.
- VINNER, L.; MOURIER, T.; FRIIS-NIELSEN, J.; et al. Investigation of Human Cancers for Retrovirus by Low-Stringency Target Enrichment and High-Throughput Sequencing. *Scientific Reports*, v. 5, n. August, p. 1–13, 2015. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep13201>>..
- VONÈCHE, V. The 19-27 amino acid segment of gp51 adopts an amphiphilic structure and plays a key role in the fusion events induced by bovine leukemia virus. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 21, p. 15193–15197, 1992.
- VONÈCHE, V.; PORTETELLE, D.; KETTMANN, R.; et al. Fusogenic segments of bovine leukemia virus and simian immunodeficiency virus are interchangeable and mediate fusion by means of oblique insertion in the lipid bilayer of their target cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 89, n. 9, p. 3810–3814, 1992.
- WEISS, R. A. Retrovirus classification and cell interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 37, n. suppl B, p. 1–11, 1996. Oxford University Press (OUP).

- WHITE, J. Membrane Fusion. **Science**, v. 258, n. 5084, p. 917–924, 1992.
- WILLEMS, L.; BURNY, A.; COLLETE, D.; et al. Genetic determinants of bovine leukemia virus pathogenesis. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 16, n. 16, p. 1787–1795, 2000.
- WILLEMS, L.; GRIMONPONT, C.; KERKHOFS, P.; et al. Phosphorylation of bovine leukemia virus Tax protein is required for in vitro transformation but not for transactivation. **Oncogene**, v. 16, n. 17, p. 2165–2176, 1998.
- WILLEMS, L.; HEREMANS, H.; CHEN, G.; et al. Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and Ha-ras oncogene product in cellular transformation. **The EMBO Journal**, v. 9, n. 5, p. 1577–1581, 1990.
- WILLEMS, L.; KETTMANN, R.; DEQUIEDT, F.; et al. In vivo infection of sheep by bovine leukemia virus mutants. **Journal of virology**, v. 67, n. 7, p. 4078–85, 1993. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8389918%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC237776>..
- XU, X.; ZHAO, H.; GONG, Z.; HAN, G. Z. Endogenous retroviruses of non-avian/mammalian vertebrates illuminate diversity and deep history of retroviruses. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 6, 2018. Public Library of Science.
- Y. YOSHINAKA, IYOKO KATOH, TERRY D. COPELAND, GARY W. SMYTHERS, A. S.; OROSZLAN. Bovine Leukemia Virus Protease: Purification, Chemical Analysis, and In Vitro Processing of gag Precursor Polyproteins. **Journal of Virology**, v. 57, n. Mar, p. 826–832, 1986. Disponível em:
<https://jvi.asm.org/content/jvi/57/3/826.full.pdf>..
- ZHANG, R.; JIANG, J.; SUN, W.; et al. Response to “Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients”. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 8–9, 2017. Breast Cancer Research. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1186/s13058-016-0763-8>..

APÊNDICES

APÊNDICE A – AMOSTRAS TESTADAS NO PRESENTE ESTUDO.

| Número da amostra | Grupo | Concentração do DNA (ng/ μ L) | Pureza do DNA (razão A ₂₆₀ /A ₂₈₀) | Teste para a β globina | Teste de nested PCR para o BLV | Clínica |
|-------------------|-------|-----------------------------------|---|------------------------------|--------------------------------|---------------|
| 52 | A | 99,9 | 1,76 | + | - | - |
| 59 | A | 54 | 1,4 | + | - | - |
| 65 | A | 45,1 | 1,8 | + | - | Lesão |
| 69 | A | 34,4 | 1,68 | + | - | NIC I |
| 72 | A | 41,3 | 1,69 | + | - | - |
| 86 | A | 38,1 | 1,83 | + | - | - |
| 104 | A | 76,2 | 1,79 | + | - | - |
| 113 | A | 30,7 | 1,77 | + | - | - |
| 128 | A | 33,6 | 1,61 | + | - | NIC I tratado |
| 146 | A | 63,7 | 1,66 | + | - | - |
| 106 | B | 11,4 | 1,35 | + | - | NIC I tratado |
| 108 | B | 17 | 1,77 | + | - | - |
| 109 | B | 11,3 | 1,74 | + | - | NIC I tratado |
| 110 | B | 20,1 | 1,82 | - | - | - |
| 111 | B | 22 | 1,8 | + | - | ASCUS |
| 112 | B | 11,9 | 1,79 | + | - | - |

| | | | | | | |
|-----|---|------|------|---|---|------------------|
| 125 | B | 6,5 | 1,49 | + | - | - |
| 126 | B | 6,7 | 1,26 | + | - | - |
| 131 | B | 6,1 | 1,18 | + | - | - |
| 132 | B | 7,9 | 1,31 | + | - | - |
| 135 | B | 8,6 | 1,73 | + | - | NIC I tratado |
| 138 | B | 9,7 | 1,64 | + | | Atipia |
| 139 | B | 16,4 | 1,67 | + | - | NIC I |
| 142 | B | 16,1 | 1,26 | - | - | - |
| 156 | B | 10,3 | 1,35 | + | - | - |
| 157 | B | 16,4 | 1,60 | + | - | - |
| 158 | B | 12,8 | 1,49 | + | - | - |
| 168 | B | 17,4 | 1,71 | + | - | - |
| 172 | B | 23,3 | 1,69 | + | - | - |
| 54 | C | 4,9 | 1,78 | - | - | - |
| 114 | C | 5,6 | 1,71 | - | - | - |
| 134 | C | 3,8 | 1,94 | - | - | - |
| 145 | C | 4,2 | 1,36 | + | - | - |
| 147 | C | 4,4 | 161 | + | - | - |

APÊNDICE B – GÉIS REPRESENTATIVOS DO TESTE DE PCR PARA GENE DA β -GLOBINA HUMANA (OS ÚLTIMOS QUATRO POÇOS DO GEL REPRESENTATIVO DO GRUPO C NÃO CONTINHAM AMOSTRAS).

