

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA EM TECIDO MAMÁRIO E
LEUCÓCITOS HUMANOS**

Juliana do Canto Olegário

Porto Alegre

2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA EM TECIDO MAMÁRIO E
LEUCÓCITOS HUMANOS**

Autora: Juliana do Canto Olegário

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Virologia Veterinária**

Orientador: Cláudio Wageck Canal

PORTO ALEGRE

2023

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Olegário, Juliana do Canto
Detecção do Vírus da Leucose Bovina em tecido
mamário e leucócitos humanos / Juliana do Canto
Olegário. -- 2023.
56 f.
Orientador: Cláudio Wageck Canal.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto
Alegre, BR-RS, 2023.

1. vírus da leucose bovina. 2. tecido mamário. 3.
leucócitos. 4. câncer de mama. 5. humano. I. Canal,
Cláudio Wageck, orient. II. Título.

Juliana do Canto Olegário

DETECÇÃO DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA EM TECIDO MAMÁRIO E
LEUCÓCITOS HUMANOS

Aprovado em 24 FEV 2023

APROVADO POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ravazzolo
Membro da Comissão

Prof. Dr. Luiz Carlos Kreutz
Membro da Comissão

Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família: à minha mãe, Ilza, ao meu pai, Assis, e à minha irmã, Isadora, por estarem comigo desde sempre e me apoiarem durante toda a minha jornada. Ao meu melhor amigo e namorado, Bernardo, pelo amor e incentivo infinitos, e pela contribuição diária e imensurável para o meu crescimento pessoal. Não tenho palavras para expressar as mudanças positivas que aconteceram na minha vida depois de te conhecer. Ao meu padrasto, Sérgio, pelo carinho e apoio desde o primeiro momento em que nos conhecemos. Às minhas tias, Flávia e Sílvia, à minha tia-avó, Lúcia, e à minha avó, Maria Augusta, por sempre torcerem por mim. Aos meus irmãos felinos, Cléo, Lelé (agora uma estrelinha no céu) e Bono, por serem meus primeiros pacientes e me ensinarem sobre o amor que apenas seres de quatro patas conseguem proporcionar. Aos meus amigos, muito obrigada pelos momentos de distração, risadas, almoços no RU, festas, conversas, tardes na piscina, noites de jogos e horas consecutivas assistindo vídeos e séries, por serem meu motivo de alegria em muitos momentos e por estarem sempre comigo. Às minhas amigas da faculdade, e agora colegas médicas veterinárias, por estarem ao meu lado nessa montanha-russa chamada Medicina Veterinária durante toda a graduação.

A todo mundo da equipe maravilhosa da Virologia Veterinária, que me acompanhou desde o quinto semestre, obrigada por serem meus professores fora da sala de aula e me proporcionarem um aprendizado incomparável. Um obrigada especial às minhas companheiras de pós-graduação e amigas Letícia, Raquel, Laura e Renata, pelo choro coletivo entre experimentos que davam errado, pelos momentos de descontração, pelo companheirismo inestimável e muito necessário. Não sei o que teria sido dos últimos dois anos sem vocês. Um agradecimento mais do que especial à minha coorientadora não oficial e amiga, Raíssa, por ser minha mentora desde o TCC até agora e me guiar nesse processo. Não tenho palavras para agradecer, tenho muita sorte de poder caminhar ao lado e contar com a ajuda de uma profissional tão incrível e inspiradora. E, ao meu orientador, Cláudio Canal, por ter me acolhido no laboratório e ter acreditado no meu potencial durante anos, e por ser extremamente gentil e compreensivo. Por fim, um agradecimento a todas as instituições financiadoras da pesquisa brasileira e a todos os cidadãos que valorizam e protegem a ciência e a democracia do nosso país.

RESUMO

O vírus da leucose bovina (BLV), membro da família *Retroviridae* e do gênero *Deltaretrovirus*, é um vírus envelopado de genoma composto por duas fitas de RNA não complementares e é o agente etiológico da leucose enzoótica bovina. Ele infecta células do sistema imune, da glândula mamária e células endoteliais dos bovinos. Os animais acometidos podem ser assintomáticos, apresentar linfocitose persistente ou desenvolver linfomas de células B em diversos órgãos, o que corresponde à forma clínica e mais grave da doença que acontece em menos de 10% dos casos. Além dos bovinos, o vírus pode infectar inúmeros outros mamíferos de forma natural ou experimental. Existem cada vez mais evidências de que os humanos também são passíveis de infecção pelo BLV e de que ele pode estar associado ao desenvolvimento de câncer de mama em mulheres. Assim, o objetivo do estudo foi determinar a presença do DNA do vírus em tecido mamário, tanto fresco como fixado e parafinizado, e leucócitos de mulheres submetidas a cirurgia mamária em Porto Alegre, RS, Brasil. Foram testadas amostras de tecido fresco e leucócitos por PCR e *nested*-PCR para quatro genes do BLV, e o resultado confirmado por sequenciamento Sanger. Também foram testados tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) por PCR e *semi-nested*-PCR para dois genes virais. Até o presente, há somente um estudo publicado que reporta a detecção do DNA do BLV em amostras de tecido mamário fresco de mulheres colombianas. Os resultados e conclusões serão disponibilizados após o artigo científico que trata do projeto ser aceito para publicação em periódico.

Palavras-chave: vírus da leucose bovina; tecido mamário; leucócitos; câncer de mama; humano

ABSTRACT

The bovine leukemia virus (BLV), a member of the Retroviridae family and the Deltaretrovirus genus, is an enveloped single-stranded RNA virus and the causative agent of enzootic bovine leukosis. BLV infects immune cells, mammary gland cells and endothelial cells of cattle. Affected animals can be asymptomatic, present persistent lymphocytosis, or develop B-cell lymphomas in several organs, which corresponds to the most severe form of the disease and occurs in less than 10% of cases. Besides cattle, the virus can infect numerous other animal species naturally or experimentally. There is increasing evidence that humans are also susceptible to BLV infection, which may be associated with breast cancer in women. This study aimed to determine the presence of viral DNA in fresh and formalin fixed paraffin embedded (FFPE) breast tissue and leukocytes from women undergoing breast surgery in Porto Alegre, RS, Brazil. Fresh tissue and leukocyte samples were tested by PCR and nested-PCR targeting four BLV genes, and results were confirmed by Sanger sequencing. Also, FFPE tissues were tested by PCR and semi-nested-PCR for two viral genes. Currently, there is only one published study reporting the detection of BLV DNA in fresh breast tissue samples from Colombian women. The results and conclusions will be available as soon as the research article has been accepted for publication.

Keywords: bovine leukemia virus; breast tissue; leucocytes; breast cancer; human

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Subfamílias e gêneros virais da família <i>Retroviridae</i>	13
Figura 2 –	Organização genômica do provírus e estrutura do vírion do BLV.....	15
Figura 3 –	Árvore filogenética dos 11 genótipos atuais descritos para o BLV baseados em sequências parciais do gene <i>env</i>	22
Figura 4 –	Taxa de mortalidade por câncer de mama no Brasil e suas regiões de 1980 até 2020.....	23
Figura 5 –	Resultados da IS-PCR para um fragmento do gene <i>tax</i> e da imunohistoquímica para o antígeno p24 do BLV em amostras de tecido mamário de mulheres.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Espécies virais do gênero <i>Deltaretrovirus</i>	14
-------------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	Vírus da Leucose Bovina	13
2.1.1	Genoma e proteínas virais	14
2.1.2	Replicação e transmissão viral	17
2.1.3	Patogenicidade viral	18
2.1.4	Prevalência e genótipos virais	20
2.2	Câncer de mama em mulheres	23
2.3	BLV em humanos	25
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	MANUSCRITO CIENTÍFICO	32
5	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1 INTRODUÇÃO

Os membros da família *Retroviridae* são amplamente distribuídos entre vertebrados e podem estar associados a uma grande variedade de doenças, que incluem leucemias, linfomas, carcinomas, imunodeficiências, doenças autoimunes e doenças neuronais. Os retrovírus englobam diversos vírus de importância para a saúde humana e animal, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), os vírus da imunodeficiência e da leucemia felinas (FIV e FeLV), os vírus T-linfotrópicos de humanos (HTLV), o vírus da leucose aviária (ALV), o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV) e o vírus da leucose bovina (BLV) (COFFIN *et al.*, 2021).

Os retrovírus codificam a enzima transcriptase reversa e, assim, têm a capacidade de transcrever seu RNA genômico em DNA fita dupla e integrá-lo no genoma da célula infectada como provírus. Os provírus que resultaram da infecção de células germinativas são herdados pela progênie e são conhecidos como retrovírus endógenos (ERV). A maioria dos vertebrados possui milhares de *loci* de ERV no seu genoma, mas grande parte sofreu inativação por mutações e perdeu a capacidade de produzir vírions infecciosos (COFFIN *et al.*, 2021).

O BLV é causador de uma infecção predominantemente assintomática que pode evoluir para a leucose enzoótica bovina, a qual, nos casos mais graves, cursa com o desenvolvimento de linfomas de linfócitos B em diversos tecidos e órgãos do animal (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Além dos bovinos, pode infectar outras espécies animais, de forma natural ou experimental (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018). Ao longo das últimas décadas, acumularam-se evidências de que pode ser infeccioso para humanos (BUEHRING *et al.*, 2014, 2019; CANOVA *et al.*, 2021; DELARMELINA *et al.*, 2020; OLAYA-GALÁN *et al.*, 2021) tornando-se relevante para a saúde pública. O BLV é capaz de infectar células epiteliais da glândula mamária de vacas (BUEHRING; KRAMME; SCHULTZ, 1994) e pode causar neoplasia dos linfócitos B infectados; além disso, é estreitamente relacionado e apresenta muitas similaridades com o HTLV-1, um deltaretrovírus de humanos que causa leucemia/linfoma de células T em adultos (SAGATA *et al.*, 1985).

Sendo assim, a presença do BLV tem sido bastante pesquisada em tecido mamário humano, bem como sua possível participação no câncer de mama em mulheres (BUEHRING *et al.*, 2014, 2017; CANOVA *et al.*, 2021; DELARMELINA *et al.*, 2020; OLAYA-GALÁN *et al.*, 2021). Este é o tipo de câncer que mais atinge e causa óbito em mulheres no mundo (WHO, 2021), por isso é imprescindível compreender melhor a etiologia multifatorial da doença e o papel de um vírus de bovinos como possível iniciador da transformação celular, além da

tentativa de identificar potenciais rotas de infecção em humanos para desenvolver estratégias de controle e prevenção.

Tanto o DNA viral como a proteína do capsídeo p24 já foram identificados em tecido mamário de mulheres (BUEHRING *et al.*, 2014; OLAYA-GALÁN *et al.*, 2021), assim como o provírus e anticorpos anti-BLV já foram detectados no sangue humano (BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003; BUEHRING *et al.*, 2019). Além disso, a presença do DNA do vírus na mama está relacionada ao desenvolvimento de câncer (BUEHRING *et al.*, 2017). Em controvérsia, outros estudos relataram a ausência de detecção do BLV em amostras humanas (ADEKANMBI *et al.*, 2021; YAMANAKA *et al.*, 2022). A principal fonte de infecção especulada é através da alimentação com produtos bovinos, como leite e carne crus ou malcozidos, o que é apoiado pelo fato do vírus estar presente em carne e leite destinados ao consumo humano (OLAYA-GALÁN *et al.*, 2017) e haver a circulação de tipos virais comuns entre tecido mamário humano, amostras bovinas e produtos alimentícios bovinos, indicando que a presença do vírus em humanos não parece ser um caso isolado (CANOVA *et al.*, 2021; CORREDOR-FIGUEROA *et al.*, 2021).

Ainda há poucos dados na literatura sobre o teste de tecido mamário humano fresco, visto que a grande maioria dos estudos publicados sobre o assunto utilizou tecidos fixados e parafinados destinados à histopatologia. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a presença do DNA viral em amostras de tecido mamário fresco, além de sangue e tecido fixado, cuja motivação foi a hipótese de que, a partir de tecidos frescos, poderia se obter um percentual alto de resultados positivos, já que seria possível superar as dificuldades inerentes que a fixação e parafinização causam ao ácido nucleico das amostras. O estudo realizado contribui para o conjunto de dados existentes relativos ao Brasil e acerca da linha de pesquisa com BLV no geral, e representa um passo na elucidação do potencial caráter zoonótico do vírus.

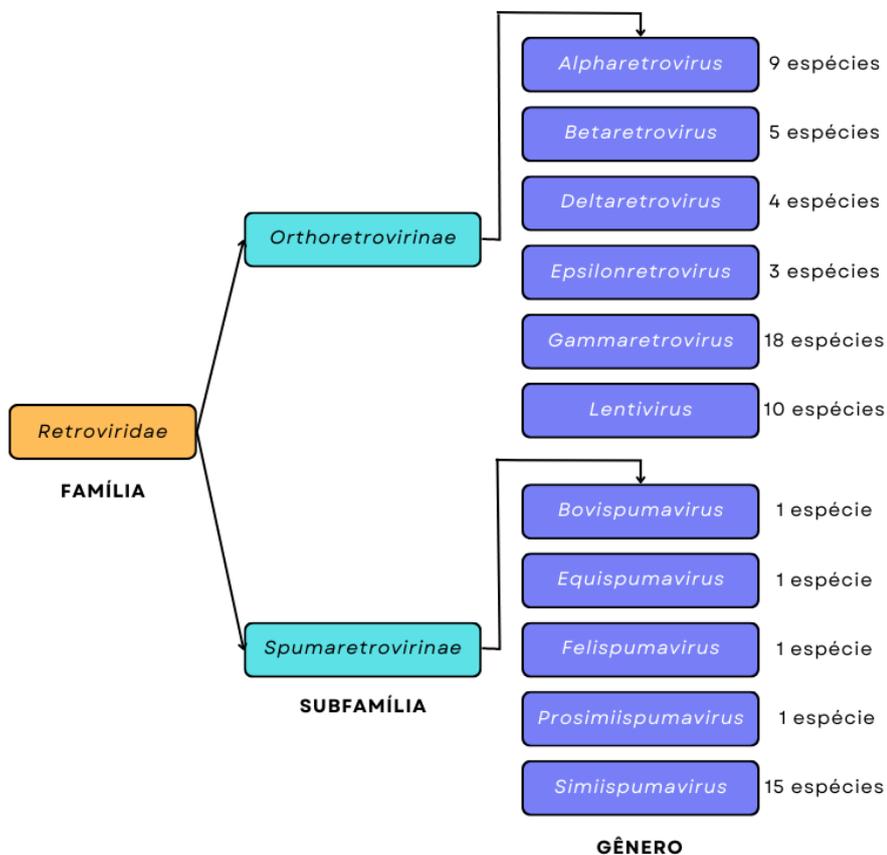
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seguir, é feita uma revisão bibliográfica sobre os aspectos importantes do BLV. Isso auxiliará na compreensão do agente em si, do seu possível envolvimento com patologias em humanos e dos experimentos realizados no decorrer do trabalho, bem como dos resultados encontrados e discussão feita a partir deles.

2.1 Vírus da Leucose Bovina

A família *Retroviridae* pertence à ordem *Ortovirales* e compreende duas subfamílias, *Orthoretrovirinae* e *Spumaretrovirinae*, dentro das quais encontram-se 11 gêneros (Figura 1). Os vírions são envelopados, possuem glicoproteínas de superfície e têm tamanho aproximado de 80 a 100 nm de diâmetro. O capsídeo contém o genoma viral e as enzimas de replicação e sua morfologia varia conforme os gêneros (COFFIN *et al.*, 2021).

Figura 1 – Subfamílias e gêneros virais da família *Retroviridae*



Fonte: a própria autora (2023).

O vírus da leucose bovina (BLV) pertence ao gênero *Deltaretrovirus*, que é composto por quatro espécies: o BLV e os vírus T-linfotrópicos de primatas 1, 2 e 3 (PTLV-1, 2 e 3) (Tabela 1). As três espécies de PTLV englobam os vírus T-linfotrópicos de humanos (HTLV-1, 2 e 3) e de símios (STLV-1, 2 e 3), denominados de acordo com o hospedeiro em que são encontrados (humanos ou primatas não humanos, respectivamente) (WOLFE *et al.*, 2005).

Tabela 1 – Espécies virais do gênero *Deltaretrovirus*

	Species	Virus name	Abbrev.
★	<i>Bovine leukemia virus</i>	bovine leukemia virus	BLV
★	<i>Primate T-lymphotropic virus 1</i>	primate T-lymphotropic virus 1	PTLV1
★	<i>Primate T-lymphotropic virus 2</i>	primate T-lymphotropic virus 2	PTLV2
★	<i>Primate T-lymphotropic virus 3</i>	primate T-lymphotropic virus 3	PTLV3

Fonte: adaptado de ICTV (2023).

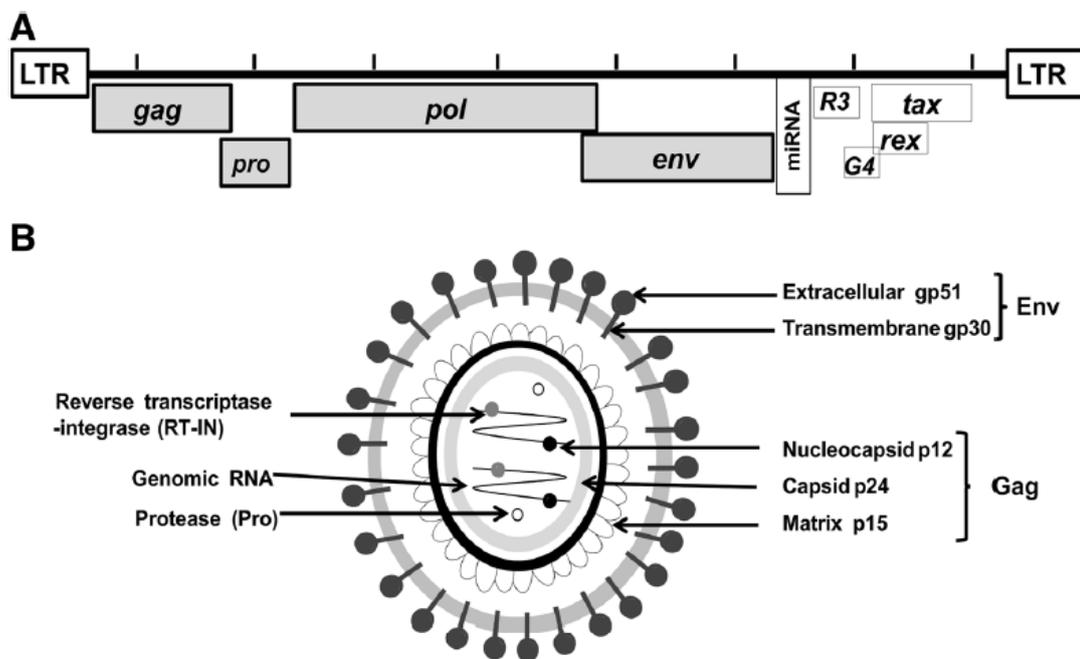
Outros vírus relacionados, como o HTLV-4 e o STLV-5, já foram relatados, porém ainda não classificados (WOLFE *et al.*, 2005; LIÉGEOIS *et al.*, 2008). As infecções por deltaretrovírus apresentam longo período de latência e estão associadas a leucemias de linfócitos B ou T e linfomas, assim como doenças neurológicas. O genoma dos mamíferos possui uma grande quantidade de ERV; no caso de deltaretrovírus endógenos especificamente, são considerados extremamente raros, porém alguns trabalhos já descreveram sua possível presença no genoma de morcegos, cetáceos e outros mamíferos (FARKAŠOVÁ *et al.*, 2017; HRON *et al.*, 2018; HRON; ELLEDER; GIFFORD, 2019).

2.1.1 Genoma e proteínas virais

O genoma dos deltaretrovírus é composto por duas moléculas lineares idênticas de RNA fita simples e polaridade positiva, cada qual com aproximadamente 8,3 quilobases. As fitas se mantêm unidas por ligações de hidrogênio, são poliadeniladas na extremidade 3' e possuem uma estrutura *cap 7-metil* na extremidade 5' (COFFIN *et al.*, 2021). Assim como os outros membros da família, os deltaretrovírus possuem os genes principais *gag*, *pro*, *pol* e *env*, que

codificam as proteínas estruturais e as enzimas virais. Além disso, contêm dois genes únicos não estruturais, denominados *tax* e *rex*, que estão relacionados a proteínas regulatórias da síntese e processamento do RNA viral (COFFIN *et al.*, 2021). O BLV ainda codifica microRNAs (miRNAs) e duas proteínas acessórias R3 e G4 (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). O genoma é flanqueado nas extremidades por regiões iguais chamadas de repetições longas terminais (LTR) (Figura 2). Cada LTR é formada por três partes consecutivas denominadas U3, R e U5 (COFFIN *et al.*, 2021). Na LTR 5', a U3 possui sequências regulatórias da transcrição e os mRNAs virais são iniciados na primeira base da R. Na LTR 3', a U3 e a R contêm a sequência sinal e o sítio de poliadenilação, respectivamente (SCHWARTZ; LÉVY, 1994).

Figura 2 – Organização genômica do provírus e estrutura do vírion do BLV



Fonte: Polat; Takeshima; Aida (2017).

A transcrição do genoma do BLV resulta em, pelo menos, sete mRNAs virais obtidos por *splicing* alternativo (SCHWARTZ; LÉVY, 1994). Um mRNA de todo o genoma é utilizado para a tradução de proteínas derivadas dos genes *gag*, *pro* e *pol*, o que resulta na formação de precursores poliproteicos que são clivados nas proteínas do capsídeo e nas enzimas virais (COFFIN *et al.*, 2021). O gene *gag* codifica as proteínas estruturais internas e não glicosiladas da matriz (MA – p15), do capsídeo (CA – p24) e do nucleocapsídeo (NC – p12). A p15 interage tanto com o genoma viral quanto com a bicamada lipídica da membrana viral; a p12 se liga às duas fitas de RNA genômico; e a p24 é a principal constituinte do capsídeo viral e o principal alvo da resposta imune do hospedeiro. O gene *pro* codifica a protease viral, responsável por

clivar os precursores *gag*, *pro*, *pol* e *env* e originar as proteínas maduras, e o gene *pol* codifica a transcriptase reversa (RT), que possui atividades de DNA polimerase dependente de RNA, de RNAase H e de integrase (IN) (SCHWARTZ; LÉVY, 1994).

Um mRNA com um *splicing* traduz o gene *env* em uma proteína precursora das duas proteínas do envelope, transmembrana (TM – gp30) e de superfície (SU – gp51). A gp51 é encontrada na superfície da membrana viral e assegura o reconhecimento do receptor celular viral; a gp30 se insere na bicamada lipídica e ancora o complexo gp51/gp30 no envelope e na membrana da célula infectada. A associação gp51/gp30 ajuda na fusão das membranas durante a infecção da célula do hospedeiro e na formação de sincício (SCHWARTZ; LÉVY, 1994). Um mRNA com dois *splicings* codifica as duas proteínas regulatórias Tax e Rex, e dois outros mRNAs codificam as duas proteínas acessórias R3 e G4. A Tax tem a função de estimular o início da transcrição a partir da região U3 na LTR 5'. A U3 possui três elementos de 21 pares de base responsivos à transativação da Tax, os quais contêm um núcleo de oito pares de base homólogo ao elemento responsivo ao AMP cíclico (CRE). A Tax não se liga diretamente ao DNA, o que implica que fatores celulares nucleares são necessários para mediar a transativação. A proteína forma um complexo com o fator nuclear *CRE-binding-protein-2* (CREB2) e com o fator de ativação da transcrição 2 (ATF-2), aumentando a afinidade deles pelo CRE da região U3 (WILLEMS *et al.*, 1992). Uma mutação que transforma o núcleo homólogo ao CRE da LTR 5' na sua sequência consenso aumenta a eficiência do promotor, mas prejudica a replicação viral, o que sugere um mecanismo que reduz a transcrição basal do vírus e facilita a fuga do sistema imune (BAREZ *et al.*, 2015).

A Rex é responsável pela regulação da expressão viral através do controle pós-transcrição, favorecendo o acúmulo e o processamento no citoplasma dos mRNAs que codificam as proteínas estruturais e as enzimas virais (SCHWARTZ; LÉVY, 1994). A R3 inibe e a G4 potencializa a função da Rex. Ambas são dispensáveis para a patogênese, mas contribuem para a manutenção de altas cargas virais, a eficiência da replicação e a duração e latência da doença (BAREZ *et al.*, 2015). Os micro-RNAs virais, codificados pela RNA polimerase-III, são fortemente expressos em células malignas e pré-leucêmicas e podem ter papel no início e na progressão dos tumores (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017).

2.1.1 Replicação e transmissão viral

A entrada do vírion na célula é mediada pela interação entre a proteína de superfície, gp51, e receptores específicos da célula hospedeira, resultando em fusão do envelope viral com

a membrana plasmática. O receptor celular relacionado à infecção pelo BLV ainda não foi claramente elucidado, mas estudos recentes propõem que o receptor CAT1/SLC7A1 (*cationic amino acid transporter 1/solute carrier family 7 member 1*) esteja envolvido, tornando a célula suscetível à infecção viral (BAI *et al.*, 2019; SATO *et al.*, 2020). A replicação começa com a transcrição reversa do RNA em cDNA, usando uma molécula de tRNA associada à extremidade 5' do genoma do vírus como *primer* para síntese de uma fita de cDNA de sentido negativo. Isso envolve a concomitante digestão do RNA viral devido à atividade de RNase H da RT. Um produto dessa hidrólise serve como *primer* para síntese da fita de cDNA de sentido positivo a partir da cópia de sentido negativo. O DNA retroviral se integra no DNA cromossômico do hospedeiro, formando um provírus. Ele pode se integrar em muitos locais do genoma celular, porém, uma vez integrado, a sequência é aparentemente incapaz de realizar transposição dentro da mesma célula (COFFIN *et al.*, 2021).

Os animais infectados podem apresentar integração mono ou oligoclonal, ou seja, um ou mais locais de integração do provírus (MAEZAWA; INOKUMA, 2020), e ela ocorre preferencialmente em locais transcricionalmente ativos do genoma (ROSEWICK *et al.*, 2017). Nos estágios iniciais de infecção, o BLV favorece sua inserção em regiões promotoras, principalmente em animais menores de três anos, o que resulta no aumento da carga proviral (MAEZAWA; INOKUMA, 2020). Porém, linfócitos B infectados com alta atividade gênica viral são eliminadas pela resposta imune, prevalecendo a sobrevivência de células com baixa taxa de expressão dos genes virais, o que, em última análise, leva à instauração de latência e ao surgimento de tumores após longos períodos (GILLET *et al.*, 2013). Conseqüentemente, a transcrição do genoma do vírus ocorre raramente (BUEHRING *et al.*, 2015), e linfócitos expressando antígenos virais tem vida encurtada (BAREZ *et al.*, 2015). Ou seja, a infecção pelo BLV é raramente replicativa *in vivo*, sendo incomum a presença de vírions no sangue periférico dos bovinos (GILLET *et al.*, 2007). A replicação e propagação do vírus ocorre, principalmente, através da divisão mitótica e expansão clonal dos linfócitos infectados, resultando na presença de diversos clones de abundância variável (ROSEWICK *et al.*, 2017). A deleção de segmentos dos genes *gag*, *pol* e *env* nos provírus integrados é observada, o que provê vantagem seletiva às células infectadas e representa um mecanismo viral de escape da resposta imune do hospedeiro. Por outro lado, a deleção das regiões LTR e *tax* raramente acontece, sendo consideradas as duas regiões mais conservadas do genoma do BLV, sendo que a LTR apresenta maior variação na sequência de nucleotídeos entre diferentes estirpes em comparação ao gene *tax* (GILLET *et al.*, 2007).

A infecção natural pelo BLV já foi relatada em bovinos, búfalos (MEAS *et al.*, 2000), capivaras (BURNY *et al.*, 1988), alpacas (LEE *et al.*, 2012) e iaques (MA *et al.*, 2016), mas pode ocorrer experimentalmente em uma grande variedade de espécies animais, como ratos, coelhos (DIMITROV *et al.*, 2012), galinhas (ALTANEROVA *et al.*, 1990) e cabras (OLSON *et al.*, 1981). Ovelhas, em especial, são extremamente sensíveis à infecção experimental e desenvolvem linfossarcomas em mais de 90% dos casos, sendo bastante utilizadas como modelo para estudo do vírus (VIRUS *et al.*, 1981). Células humanas são suscetíveis à infecção *in vitro* (OLAYA-GALÁN *et al.*, 2022).

A transmissão do BLV depende, principalmente, da transferência das células infectadas de um animal para outro, as quais estão presentes no sangue, nos tumores e em vários fluidos corporais (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018). A contaminação ocorre majoritariamente de forma iatrogênica, através de materiais contaminados com sangue infectado, em procedimentos como injeção, descorna, colocação de brinco e palpação retal (HOPKINS; DIGIACOMO, 1997). Insetos hematófagos podem atuar como vetores (PANEI *et al.*, 2019), secreções nasais e bronquiais podem ser uma fonte de infecção, especialmente em ambientes de confinamento e superlotação (SCHWARTZ; LÉVY, 1994), e bezerras podem se infectar dentro do útero durante a gestação (SAJIKI *et al.*, 2017). Tanto o colostro como o leite podem conter o vírus e serem responsáveis pela transmissão para animais lactentes (ROMERO; CRUZ; ROWE, 1983; GUTIÉRREZ *et al.*, 2015). Apesar de antígenos virais e de DNA proviral serem detectados no sêmen e na saliva, a infecção natural através dessas secreções não foi claramente demonstrada (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018).

2.1.3 Patogenicidade viral

A infecção pelo BLV pode se apresentar de três formas: 1) Aleuquêmicos (AL): a maioria dos animais infectados carrega o vírus de forma assintomática, sem alterações clínicas ou na contagem de linfócitos totais, podendo apresentar uma elevação na proporção de linfócitos B/T (PANEI *et al.*, 2013); 2) Linfocitose Persistente (LP): 30 a 70% dos animais desenvolvem uma proliferação não maligna de linfócitos B, que resulta na elevação do número de linfócitos totais (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018); 3) Linfoma de Células B: 0,1% a 10% dos animais infectados desenvolvem tumores malignos (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018) de um a oito anos após a infecção, o que corresponde à forma clínica e mais grave da doença, conhecida como leucose enzoótica

bovina, que é geralmente vista em animais acima de dois a três anos de idade (SCHWARTZ; LÉVY, 1994).

Os tumores se originam do acúmulo mono ou oligoclonal de linfócitos B CD5+ IgM+, e podem afetar um ou mais linfonodos, resultando em uma linfadenomegalia considerável, além de induzir ruptura do baço (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Células neoplásicas também podem se infiltrar em outros órgãos como abomaso, coração, intestino, rins, pulmão, fígado, útero (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018) e glândula mamária (BUEHRING; KRAMME; SCHULTZ, 1994), o que faz com que os sinais clínicos sejam muito variáveis e dependentes do local de desenvolvimento dos tumores. Os animais infectados clinicamente saudáveis podem exibir certo grau de desregulação imunológica que leva a perdas econômicas por diversos motivos (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017), como aumento na incidência de doenças infecciosas (SANDEV *et al.*, 2004), diminuição na produção de leite (NEKOU EI *et al.*, 2016) e na imunidade protetora reduzida após vacinação (FRIE *et al.*, 2016), e ineficiência reprodutiva (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018).

Ainda que as alterações causadas pelo BLV estejam majoritariamente relacionadas com os linfócitos B, principalmente CD5+ IgM+, o vírus pode infectar outras populações celulares do sistema imune, como linfócitos T, monócitos e granulócitos no sangue periférico e nos tecidos linfoides (SCHWARTZ *et al.*, 1994), além de células epiteliais mamárias (BUEHRING; KRAMME; SCHULTZ, 1994) e células endoteliais (ROVNAK *et al.*, 1991). Após uma viremia observada durante as duas primeiras semanas de infecção, os bovinos desenvolvem resposta sorológica a proteínas do envelope e do capsídeo viral que permanece detectável por toda a vida do animal. Anticorpos contra as proteínas regulatórias Tax e Rex também podem ser encontrados (SCHWARTZ; LÉVY, 1994). Os anticorpos podem ser detectados no soro e no leite do animal (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017).

Nenhum deltaretrovírus contendo oncogenes foi oficialmente identificado até agora (COFFIN *et al.*, 2021), porém, o mecanismo oncogênico do BLV e seu potencial transformante são historicamente atribuídos à proteína Tax e seu gene correspondente. Tanto a Tax do BLV como a Tax do HTLV-1 parecem afetar o controle de multiplicação da célula e propiciar o acúmulo de mutações no genoma celular através da inibição do reparo do DNA pela interação com enzimas envolvidas na supressão da carcinogênese (GILLET *et al.*, 2007). Os mRNAs podem ser detectados em animais com linfocitose persistente ou com tumores, o que sinaliza que o gene viral está sendo transcrito (HAAS; DIVERS; CASEY, 1992), porém, sua expressão nem sempre é encontrada em estágios tumorais avançados (SAGATA *et al.*, 1985; MERIMI *et al.*, 2007), e é observada uma grande frequência de provírus contendo alterações que inativam

a Tax (TAKEDA *et al.*, 2004). Ela provê vantagem proliferativa aos clones infectados, mas também faz deles alvo da resposta imune citotóxica, sendo propício silenciar sua expressão, portanto, é amplamente aceito que ela tem papel essencial nos estágios iniciais do processo oncogênico, mas não é necessária em estágios avançados para a progressão maligna (ROSEWICK *et al.*, 2017).

Outro fator que pode contribuir para a malignidade do vírus é o local de inserção do provírus no genoma do hospedeiro. Como a sequência do BLV varia pouco nos e entre hospedeiros, e como pode existir uma grande variedade de clones dentro de um mesmo animal infectado, é hipotetizado que o local de integração do provírus é o principal atributo que distingue uma célula infectada da outra e represente um elemento chave para a transformação maligna (ROSEWICK *et al.*, 2017). Inicialmente, na fase assintomática, a inserção privilegia regiões próximas a promotores de transcrição, causando perturbação no gene subsequente e contribuindo para o acúmulo de células infectadas e para a progressão maligna (GILLET *et al.*, 2013). Também já foi demonstrado que, em células tumorais infectadas pelo BLV e pelo HTLV-1, os vírus integram em regiões vizinhas a genes relacionados ao câncer, podendo provocar a perturbação de tais genes e, assim, promover o curso maligno da doença por favorecer a existência de linfócitos B com sobrevivência e proliferação aumentadas (ROSEWICK *et al.*, 2017). Apesar disso, ainda não há evidências sólidas de integrações provirais recorrentes e, em tumores, não foram identificados locais preferenciais claros associados com clones malignos.

O papel transformante do vírus também poderia ser desempenhado pelo bloqueio de genes relacionados à apoptose e à supressão de tumores (GILLET *et al.*, 2013). Alguns fatores genéticos têm impacto na progressão da doença, como a diminuição na expressão do Fator de Necrose Tumoral alpha (TNF- α) pela célula infectada, o que é consequência de um polimorfismo na região promotora do gene (KONNAI *et al.*, 2006), e a presença no hospedeiro de alelos específicos do gene BoLa-DRB 3, que está relacionado aos perfis de carga viral apresentados pelos bovinos infectados (JULIARENA *et al.*, 2016).

2.1.4 Prevalência e genótipos virais

O primeiro caso de leucose enzoótica bovina foi descrito em 1871 no leste da Prússia, atualmente Klaipeda na Lituânia; posteriormente, o vírus foi introduzido em outros países através do comércio de animais infectados e se disseminou mundialmente. Alguns países da Europa implementaram programas de erradicação do vírus durante o século XX, como

Dinamarca, Finlândia, Suíça e Holanda, e, hoje, são considerados livres do BLV (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Entretanto, em outros países europeus, como Itália, Portugal, Grécia e Bulgária, o vírus ainda está presente, mas a doença é ausente ou limitada a áreas específicas. Estratégias nacionais de controle e erradicação também foram impostas na Nova Zelândia e na Austrália, e os rebanhos bovinos leiteiros são livres da doença em ambos os países (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Nos Estados Unidos, é estimado que 84% dos rebanhos de leite e 39% dos rebanhos de corte estejam infectados (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017).

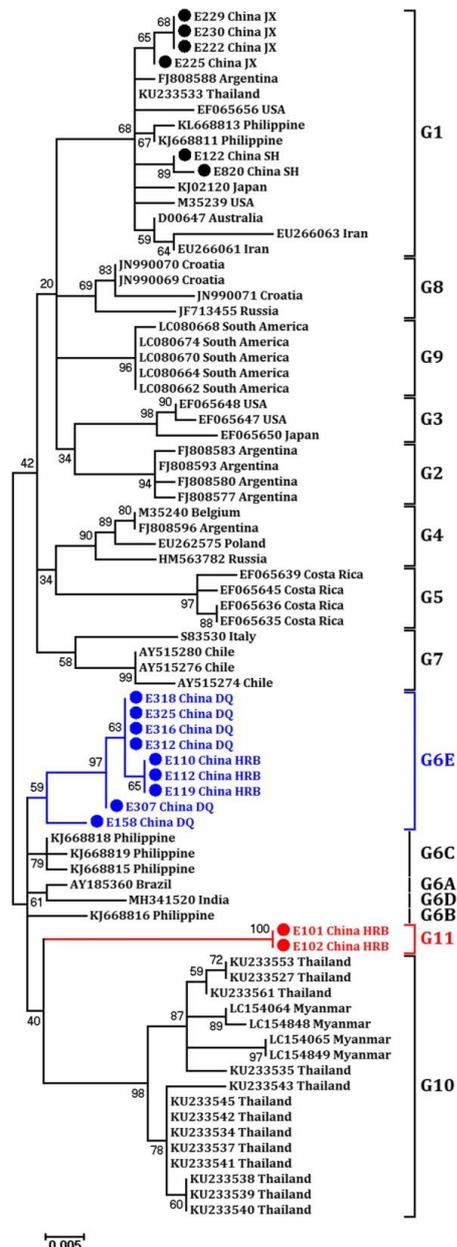
Na América do Sul, a frequência do BLV é relativamente alta, e a doença ocorre em quase todos os países. No Brasil, os resultados de ensaios sorológicos pesquisando anticorpos anti-BLV variam muito entre os diferentes Estados, sendo que eles foram encontrados em 56,34% dos animais de rebanhos no Paraná (BARROS FILHO *et al.*, 2010), em 41% na Bahia (MATOS; BIRGEL JÚNIOR; BIRGEL, 2005), em 32,1% em Pernambuco (MENDES *et al.*, 2011), e em 61,5% de propriedades no Rio Grande do Sul (FRANDOLOSO *et al.*, 2008). Na Ásia, o vírus circula nos rebanhos de diversos países, como China (YANG *et al.*, 2019), Japão (MURAKAMI *et al.*, 2011), Tailândia (LEE *et al.*, 2016), Índia (GAUTAM *et al.*, 2018) e Myanmar (MOE *et al.*, 2020).

Para a classificação do BLV em genótipos, a região do gene *env* que codifica a gp51 tem sido histórica e amplamente utilizada na realização de análises filogenéticas do BLV devido às suas importantes funções biológicas, além de ser um dos principais alvos dos anticorpos neutralizantes (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Atualmente, são descritos onze genótipos baseados em sequências parciais ou totais da região genômica da gp51 (Figura 3), nomeados de Genótipo-1 (G1) até Genótipo-11 (G11) (YU *et al.*, 2019), cujos isolados agrupam de acordo com sua origem geográfica.

O último genótipo descrito, G11, foi identificado na China em 2019 (YU *et al.*, 2019). Os genótipos G1, G4 e G6 têm ampla distribuição e foram detectados pelo mundo todo. O G1 é o mais prevalente e está presente em quase todos os continentes (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). O G4 é o segundo mais amplamente distribuído e foi identificado principalmente em países da Europa e América, mas também em outros como Egito (HAMADA *et al.*, 2020), Irã (KAZEMIMANESH *et al.*, 2021), Mongólia (OCHIRKHUU *et al.*, 2016) e China (YANG *et al.*, 2019). Especula-se que o G6 tenha se originado na América do Sul e disseminado para a Ásia através do comércio animal, já tendo sido encontrado em países como Argentina, Brasil (MORATORIO *et al.*, 2010), Bolívia, Paraguai e Peru (POLAT *et al.*, 2016), assim como Tailândia (LEE *et al.*, 2016), Myanmar (MOE *et al.*, 2020), China (YANG *et al.*, 2019; YU *et*

al., 2019), Índia (GAUTAM *et al.*, 2018) e Paquistão (ROLA-ŁUSZCZAK *et al.*, 2021). Alguns genótipos são mais observados em áreas geograficamente próximas, como o G2 e o G5 na América do Sul (MORATORIO *et al.*, 2010), o G8 no leste da Europa e Sibéria (BALIĆ *et al.*, 2012; ROLA-ŁUSZCZAK *et al.*, 2013), e o G10 em países do sudeste asiático (LEE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018; LE *et al.*, 2020; MOE *et al.*, 2020); em contraste, o G3 e o G7 podem ser encontrados em regiões geograficamente dispersas (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). O G9, por sua vez, foi identificado na Bolívia (POLAT *et al.*, 2016).

Figura 3 – Árvore filogenética dos 11 genótipos atuais descritos para o BLV baseados em sequências parciais do gene *env*

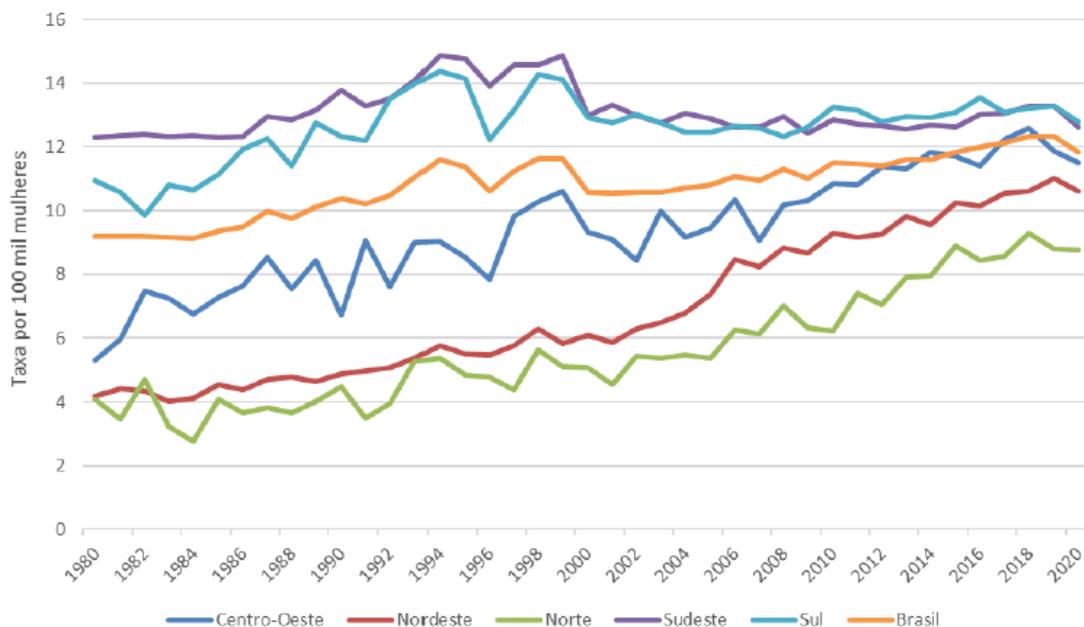


Fonte: Yu *et al.* (2019)

2.2 Câncer de mama em mulheres

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo e observou-se, em 2020, cerca de 2,3 milhões novos diagnósticos e 658 mil mortes globalmente (WHO, 2021). Para 2040, estima-se quase 2,8 milhões de casos no mundo (WHO, 2020a), sendo mais de 617 mil só nas Américas, em contraste com os cerca de 458 mil registrados em 2018 no continente (WHO, 2020b). No Brasil, também corresponde ao tipo de câncer com maior incidência e que mais causa óbito em mulheres, sendo as taxas mais altas nas regiões Sudeste e Sul (INCA, 2022). Para 2023, são estimados mais de 73 mil novos casos da doença no país (INCA, 2022). Na série histórica da taxa de mortalidade compreendendo desde 1980 até 2020 (Figura 4), observa-se uma tendência ascendente ao longo das décadas, com uma pequena desaceleração no Sudeste e no Sul (INCA, 2022).

Figura 4 – Taxa de mortalidade por câncer de mama no Brasil e suas regiões de 1980 até 2020



Fonte: INCA (2022).

O câncer de mama pode ser classificado em tipos e subtipos. Existem dois tipos: o *in situ*, que corresponde ao carcinoma ductal *in situ*, um precursor do câncer invasivo, e representa 16% dos cânceres de mama; e o invasivo, que representa 81% dos cânceres de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Os subtipos, por sua vez, podem ser divididos em

histológicos e moleculares. Os subtipos histológicos são classificados com base no tamanho, na forma e na disposição celular do tumor, e há, pelo menos, vinte e um deles, dentre os quais o carcinoma lobular infiltrante é o mais comum, porém mais de 75% dos cânceres de mama invasivos acabam sendo classificados histologicamente como “não especificados” (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Os subtipos moleculares são determinados pela análise da expressão gênica, a qual é predita por processos rotineiros de imunohistoquímica que avaliam marcadores biológicos, tais como: a presença de receptores hormonais (HR) de estrógeno (ER) e/ou progesterona (PR); de receptores tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2); e do marcador de proliferação celular Ki67. Isso é extremamente importante para a predição da resposta a terapias específicas e do prognóstico da doença. Existem quatro subtipos moleculares: luminal A (HR+/HER2-), o mais comum, que tende a ter crescimento lento e ser menos agressivo e a estar associado com os prognósticos mais favoráveis por ser responsivo a terapias hormonais; o luminal B (HR+/HER2+), caracterizado por ser altamente positivo para HER2 e/ou para a proteína Ki67; o basal-like (HR-/HER2-), também chamado de triplo-negativo (ER-, PR- e HER2-), tendo o pior prognóstico entre todos os subtipos, visto que os métodos de tratamento não avançaram tanto para este quanto para os outros subtipos; e o HER2-enriched (HR-/HER2+), que, no passado, tinha o pior prognóstico, porém o desenvolvimento de terapias específicas melhorou significativamente o resultado das pacientes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Além disso, outra análise importante relacionada ao câncer de mama é a avaliação de mutações em certos genes, sendo os mais importantes o *breast cancer 1* (BRCA1) e o *breast cancer 2* (BRCA2), que podem levar à síndrome hereditária de câncer de mama e ovário. Estima-se que entre 5 e 10% dos casos de câncer de mama podem ser atribuídos às mutações nos genes BRCA 1 e 2 (APOSTOLOU; FOSTIRA, 2013). Além disso, existem outros fatores de risco bem estabelecidos que contribuem para o desenvolvimento da doença, dentre os quais estão: idade maior de 65 anos; alterações no tecido mamário, como carcinoma ductal *in situ*, carcinoma lobular *in situ*, hiperplasia atípica e aumento de densidade; níveis altos de hormônios endógenos pré ou pós-menopausa; uso recente de contraceptivos hormonais; uso recente e prolongado de terapia hormonal na menopausa; histórico pessoal de câncer de ovário ou de endométrio; um ou mais parentes em primeiro grau com câncer de mama; consumo de álcool; obesidade e sobrepeso; falta de atividade física; nunca ter engravidado ou amamentado; e idade maior de 30 anos na primeira gestação (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

2.3 BLV em humanos

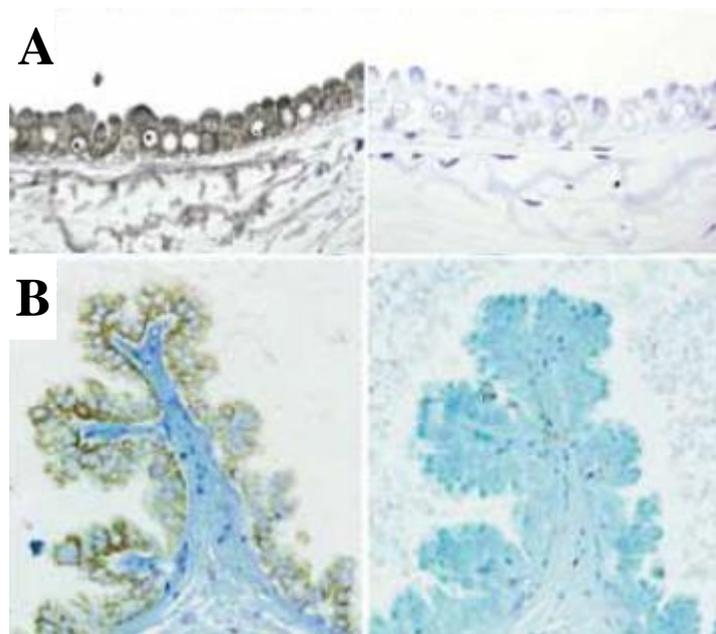
O BLV foi isolado pela primeira vez em 1964 (MILLER *et al.*, 1969) a partir de bovinos, e, por vários anos, estudos tentaram determinar se ele era ou não infeccioso para humanos. Nos anos 1970 e 1980, muitos experimentos foram realizados na tentativa de detectar anticorpos anti-BLV no soro humano, a maioria usando as técnicas de imunodifusão em gel de ágar (AGID) e fixação do complemento, e todos tiveram resultados inconclusivos ou negativos. Isso construiu e disseminou a ideia de que o BLV não é infeccioso para humanos e que nenhuma doença humana pode ser atribuída a ele (BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003). Porém, as técnicas usadas anteriormente são pouco sensíveis comparadas a técnicas mais modernas, e que bovinos negativos para anticorpos anti-BLV no AGID podem ser positivos em outros ensaios, como *immunoblotting* e ELISA (BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003). A partir dos anos 2000, diversos estudos tiveram êxito em identificar a exposição dos humanos ao vírus, seja através da detecção de anticorpos séricos anti-BLV ou de DNA e proteínas virais em células e tecidos humanos.

O primeiro estudo que detectou a presença de anticorpos anti-BLV no soro humano foi publicado pela pesquisadora e doutora estadunidense Gertrude C. Buehring e dois colegas, em 2003. Nele, 275 soros humanos foram testados contra a p24 do BLV por *immunoblotting*, dos quais 191 foram positivos (74,3%). Os resultados obtidos foram o ponto de partida para pesquisas subsequentes sobre o possível caráter zoonótico do BLV, pois confirmam a exposição humana ao vírus, mas não provam que houve infecção. Sendo assim, novos estudos surgiram em sequência com o objetivo de identificar a presença do DNA do BLV em humanos. Considerando a capacidade do vírus em infectar a glândula mamária bovina (BUEHRING; KRAMME; SCHULTZ, 1994), e resultados que demonstram a infecção do tecido mamário humano pelo retrovírus oncogênico de ratos MMTV (WANG *et al.*, 1995), a maioria dos trabalhos se dedicou à pesquisa do BLV em amostras de tecido de mama de mulheres.

A partir da década de 2010, a detecção do DNA proviral inserido no genoma do tecido mamário humano foi demonstrada em estudos da Colômbia (GIOVANNA *et al.*, 2013; OLAYA-GALÁN *et al.*, 2021), Estados Unidos (; BUEHRING *et al.*, 2014, 2015; BALTZELL *et al.*, 2018), Austrália (BUEHRING *et al.*, 2017), Argentina (LENDEZ *et al.*, 2018), Brasil (SCHWINGEL *et al.*, 2019; DELARMEINA *et al.*, 2020; CANOVA *et al.*, 2021), Irã (KHALILIAN; HOSSEINI; MADADGAR, 2019) e Paquistão (KHAN *et al.* 2022). A maior parte dos estudos testou por PCR o DNA extraído de blocos de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina, com e sem alterações malignas, provenientes de bancos de amostras

de hospitais. O percentual de positivos encontrado varia desde 22,4% na Argentina (LENDEZ *et al.*, 2018) até 86,4% no Brasil (CANOVA *et al.*, 2021). Em 2014, Buehring e colegas publicaram um trabalho descrevendo detalhadamente a metodologia de PCR *in situ* e os primers desenhados para avaliação de cinco genes do BLV (*gag*, *env*, *pol*, LTR e *tax*) em amostras FFPE, e detectaram o DNA viral nas células epiteliais secretoras da mama (Figura 5). A maioria dos estudos publicados até hoje utilizou os mesmos pares de primers para PCR *in situ* ou em fase líquida, ocasionalmente com pequenas modificações nos protocolos (GIOVANNA *et al.*, 2013; BUEHRING *et al.*, 2014, 2015, 2017; BALTZELL *et al.*, 2018; LENDEZ *et al.*, 2018; SCHWINGEL *et al.*, 2019; DELARMELINA *et al.*, 2020; CANOVA *et al.*, 2021; OLAYAGALÁN *et al.*, 2021; KHAN *et al.*, 2022). Os resultados dos sequenciamentos do DNA viral amplificado a partir dos tecidos mamários humanos revelou relação próxima e grande similaridade com sequências de BLV detectadas em bovinos (BUEHRING *et al.*, 2014; DELARMELINA *et al.*, 2020; CANOVA *et al.*, 2021), mostrando que o vírus encontrado nos tecidos humanos está geneticamente relacionado ao vírus que infecta bovinos.

Figura 5 – Resultados da IS-PCR para um fragmento do gene *tax* e da imunohistoquímica para o antígeno p24 do BLV em amostras de tecido mamário de mulheres



A: à esquerda, amplificação de um fragmento do gene *tax* do BLV por IS-PCR dentro das células epiteliais mamárias de uma paciente, evidenciada pela cor marrom escura; à direita, ausência de amplificação na mesma amostra devido à ausência de *primers* na reação, mostrando que o resultado não foi falso positivo em virtude de fatores inerentes ao tecido. **B:** à esquerda, reação positiva das

células epiteliais mamárias de uma paciente à presença de anticorpos monoclonais anti-p24 do BLV na imunohistoquímica, indicada pela cor marrom escura; à direita, ausência de reação na mesma amostra devido à ausência dos anticorpos primários no teste.
Fonte: Adaptado de Buehring *et al.* (2014).

Buehring *et al.* (2014) também identificaram, além do DNA viral, a presença do antígeno p24 nos ductos e lóbulos do epitélio mamário por imuno-*histoquímica* em 6% das amostras (Figura 5). Resultados semelhantes foram obtidos em amostras de mulheres colombianas, onde a proteína p24 foi detectada em 10% dos tecidos mamários testados (OLAYA-GALÁN *et al.*, 2021), corroborando com a hipótese de que a replicação viral, apesar de incomum, pode ocorrer em algumas pessoas. Buehring *et al.* também conseguiram, em 2019, identificar o DNA do BLV nos leucócitos humanos, ao testar amostras de sangue de 95 mulheres por *nested*-PCR e obter 38% de positivos. A presença do provírus foi demonstrada, de forma semelhante, no sangue de mulheres do Irã e da Colômbia (KHALILIAN; HOSSEINI; MADADGAR, 2019; OLAYA-GALÁN *et al.*, 2021).

Outros trabalhos, no entanto, relataram a ausência de detecção de DNA proviral em tecido mamário e leucócitos humanos na China (ZHANG *et al.*, 2016), Japão (YAMANAKA *et al.*, 2022), EUA, México e Vietnã (GILLET; WILLEMS, 2016; ADEKANMBI *et al.*, 2021) utilizando técnicas de WGS, PCR e FRET-PCR. A discrepância observada nos resultados pode ser devido a diferenças epidemiológicas entre as pacientes, como hábitos de consumo de alimentos de origem animal, na origem e características inerentes às amostras, ou na metodologia dos estudos. Adekanmbi *et al.* (2021) sugerem como abordagem para tentar entender a existência de tais evidências contraditórias a utilização de todas as técnicas e métodos de detecção descritos até agora no mesmo conjunto de amostras.

A principal forma especulada de infecção dos humanos pelo BLV é através do consumo de produtos de origem bovina. Apesar da pasteurização e o cozimento eliminarem a infectividade viral (OLAYA-GALÁN *et al.*, 2017), BUEHRING *et al.* (2015) afirma que leite cru e carne crua ou malcozida ainda são muito presentes na alimentação das pessoas em diversas partes do mundo, e o leite cru foi consumido por muito tempo antes da aplicabilidade da técnica de pasteurização ser implementada e difundida, sugerindo que o vírus poderia ter se estabelecido na população humana antes. Segmentos do gene *gag* já foram identificados em amostras de leite e carne crus destinados ao consumo humano (OLAYA-GALÁN *et al.*, 2017), e foi demonstrada *in vitro* a capacidade infecciosa de células infectadas pelo BLV no leite de vacas positivas (WATANUKI *et al.*, 2019), contribuindo para a hipótese de que produtos de origem animal na alimentação humana podem ser um meio de exposição ao vírus. Através da

análise filogenética de sequências do BLV obtidas a partir de tecidos humanos, bovinos e produtos alimentícios (leite e carne) na Colômbia, Corredor-Figueroa *et al.* (2021) observaram a co-circulação de haplótipos nas três fontes de análise, indicando uma origem comum e que a presença do vírus em humanos não é um evento isolado. Canova *et al.* (2021) também identificaram que o DNA viral detectado no tecido mamário de mulheres está geneticamente relacionado a sequências de vírus que circulam em bovinos.

Outras possíveis formas de contaminação seriam através do contato direto com os animais e seus produtos biológicos ou através de mulheres infectadas com o vírus (BUEHRING *et al.*, 2015). Tanto o BLV como o HTLV-1 podem ser transmitidos pela amamentação, o que levanta a possibilidade da transmissão do BLV ser pelo leite entre os humanos também, apesar do consumo de leite materno não ter sido associado com o desenvolvimento de câncer de mama (WISE *et al.*, 2009). Com relação à possibilidade de transmissão pelo contato físico com produtos bovinos, em ocupações profissionais envolvidas diretamente com carne e sangue dos animais, faltam trabalhos específicos avaliando tal rota de infecção. Um estudo (MORTON, 1995) analisou o risco de desenvolvimento de câncer de mama entre diferentes ocupações e concluiu que mulheres que trabalham cortando e embalando carne têm maior incidência da doença, mas o resultado se deve provavelmente ao contato direto com o material plástico da embalagem, e não com a carne crua e seus possíveis patógenos. Em contraste, outros estudos identificaram uma menor incidência de câncer de mama em açougueiros e funcionários de abatedouros e indústrias de processamento de carne (BESSON; BANKS; BOFFETTA, 2006; JOHNSON, 2011).

O papel significativo dos vírus no câncer foi reconhecido na segunda metade do século XX, após vários vírus causadores de tumor de roedores serem descobertos (RONIT; SHOU-JIANG, 2011). Atualmente, sete vírus são classificados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) no Grupo 1 de carcinogênicos para humanos: vírus Epstein Barr (EBV); vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV); papilomavírus humano (HPV); vírus T-linfotrófico humano tipo 1 (HTLV-1); herpesvírus humano 8 (HHV-8); e vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (IARC, 2012). Aproximadamente 12% dos casos de câncer em humanos são atribuídos a vírus e, pela dificuldade de acumular evidências suficientes que estabeleçam uma associação causal entre câncer e qualquer vírus, é provável que tal percentual seja subestimado (RONIT; SHOU-JIANG, 2011).

A ideia de vírus como causadores de câncer de mama foi introduzida em 1936, quando observou-se que o leite de ratas continha um fator desconhecido que causava tumores mamários nos filhotes quando crescidos, o qual foi identificado como o vírus do tumor mamário de ratos

(MMTV) (BITTNER, 1936). O MMTV é um vírus da família *Retroviridae* e do gênero *Betaretrovirus* transmitido através das células germinativas e do leite da mãe para os filhotes. Já foi identificado em câncer de mama em mulheres, porém seu papel no desenvolvimento da doença ainda é desconhecido (WANG *et al.*, 1995; LAWSON *et al.*, 2018). Outros vírus sabidamente causadores de câncer que já foram identificados em tumores mamários de mulheres, e podem ou não ter alguma relação com o seu aparecimento, são o HPV, o EBV e o BLV (LAWSON; HENG, 2010). À luz da detecção do MMTV no tecido mamário maligno de mulheres (LAWSON *et al.*, 2010), e levando em conta o potencial oncogênico do BLV em bovinos e sua semelhança ao HTLV-1, pesquisas tentaram estabelecer uma relação entre o vírus e o diagnóstico de câncer de mama em mulheres.

Estudos de caso-controle foram realizados nos Estados Unidos (BUEHRING *et al.*, 2015; BALTZELL *et al.*, 2018;), Austrália (BUEHRING *et al.*, 2017), Brasil (SCHWINGEL *et al.*, 2019; DELARMELINA *et al.*, 2020), Colômbia (OLAYA-GALÁN *et al.*, 2021) e Paquistão (KHAN *et al.*, 2022), testando amostras de tecido mamário com e sem alterações malignas para a presença do DNA viral e comparando seus resultados, e foram estimadas razões de chance (OR – *odds ratio*) variando de 0,39 no Paquistão até 15,82 no Brasil (DELARMELINA *et al.*, 2020). Um dos estudos objetivou testar se a exposição ao BLV leva ao aparecimento de câncer ao longo do tempo (BUEHRING *et al.*, 2017). Para isso, foram utilizadas amostras pareadas da mesma mulher com intervalo de coleta de três a dez anos entre elas, a fim de analisar se pacientes cujas amostras de tecido mamário eram positivas para BLV e não tinham alterações malignas na primeira cirurgia continuariam positivas para o vírus e estariam mais propensas a desenvolver câncer de mama no momento da segunda cirurgia. Constatou-se que a probabilidade de tecidos classificados como não-malignos na primeira coleta se tornarem malignos na segunda foi significativamente maior em mulheres cujas duas amostras eram positivas para o DNA do BLV, em comparação às mulheres cujas duas amostras eram negativas ou apenas uma delas era positiva. De 31 pacientes com diagnóstico de câncer na segunda coleta, 23 (74,2%) tinham diagnóstico benigno ou pré-maligno concomitante com infecção pelo BLV na primeira.

Além do câncer de mama, alguns trabalhos tentaram identificar se o BLV está presente e relacionado a outros tipos de câncer. Há indícios de que trabalhadores de abatedouros e indústrias de processamento que estão em contato direto com carne crua têm maior risco de desenvolver leucemia e câncer de pulmão (JOHNSON, 2011), e de que existe uma associação significativa entre o consumo de carne vermelha e linfoma não-Hodgkin (NHL – *non Hodgkin lymphoma*) (FALLAHZADEH *et al.*, 2014). Na Coreia do Sul, LEE *et al.* (2005) investigou a

presença do vírus em 517 amostras de pacientes com leucemia e 162 amostras de pacientes com câncer de pulmão por PCR para o gene *env* do BLV, porém não obteve resultados positivos. No entanto, dois trabalhos detectaram o DNA proviral em carcinoma de células escamosas de pulmão (ROBINSON *et al.*, 2016) e linfoma (TAGHADOSI *et al.*, 2019). O estudo feito no Irã com amostras de tecido de diversos tipos de linfoma também identificou, em dois deles, o RNA viral da Tax por RT-*nested*-PCR, demonstrando que a proteína estava sendo expressa (TAGHADOSI *et al.* 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o envolvimento do vírus da leucose bovina (BLV) na etiologia do câncer de mama humano.

3.2 Objetivos específicos

- Pesquisar a presença do DNA do BLV em amostras de tecido mamário e leucócitos provenientes de mulheres submetidas a cirurgia mamária em Porto Alegre, Rio Grande do Sul;
- Comparar os resultados obtidos entre os diferentes tipos de amostras (tecido mamário fresco; tecido mamário fixado em formalina e embebido em parafina; leucócitos);
- Verificar a frequência dos diferentes genes do BLV testados.

4 MANUSCRITO CIENTÍFICO

O manuscrito apresenta resultados preliminares de um projeto de pesquisa que segue em andamento no Laboratório de Virologia Veterinária da UFRGS em parceria com um hospital de Porto Alegre.

5 CONCLUSÃO

A leucose enzoótica bovina é bastante negligenciada na bovinocultura pela falta de sinais clínicos e de prejuízos aparentes na produção. Visto que a maioria dos animais infectados não desenvolvem a doença clínica, caracterizada pelo aparecimento de tumores malignos de linfócitos B em diversos órgãos após anos de latência, eles são mantidos na cadeia produtiva e funcionam como reservatórios, resultando em produtos contaminados (carne, leite e derivados) que chegam à mesa do consumidor. No Brasil, o vírus já foi identificado em amostras de tecido mamário fixado e parafinado de mulheres de Minas Gerais e da região Sul. Na Colômbia, o DNA viral foi detectado em tecidos mamários frescos e leucócitos. Os resultados encontrados no estudo descrito aqui podem ser devido a uma casualidade de seleção das pacientes participantes e poderiam ser explicados por diferenças inerentes à população estudada. Os resultados apresentados são preliminares e mais dados serão analisados futuramente, quando o projeto for concluído.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEKANMBI, F. *et al.* Absence of bovine leukemia virus in the buffy coats of breast cancer cases from Alabama, USA. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 161, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S088240102100512X?via%3Dihub>. Acesso em: 19 jan. 2023.

ALTANEROVA, V. *et al.* Induction of leukemia in chicken by bovine leukemia virus due to insertional mutagenesis. **Arch Geschwulst-forsch**, [S. l.], v. 60, n. 23, p. 89–96, 1990.

APOSTOLOU, P.; FOSTIRA, F. Hereditary breast cancer: The Era of new susceptibility genes. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2013, 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/747318/>. Acesso em: 19 jan. 2023.

BAI, L. *et al.* CAT1/SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection. **FASEB Journal**, [S. l.], v. 33, n. 12, p. 14516–14527, 2019. Disponível em: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1096/fj.201901528R>. Acesso em: 22 jan. 2023.

BALIĆ, D. *et al.* Identification of a new genotype of bovine leukemia virus. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 157, n. 7, p. 1281–1290, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-012-1300-4>. Acesso em: 22 jan. 2023.

BALTZELL, K. A. *et al.* Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas. **Cancer**, [S. l.], v. 124, n. 7, p. 1342–1349, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cncr.31169>. Acesso em: 19 jan. 2023.

BAREZ, P. Y. *et al.* Recent advances in BLV research. **Viruses**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 6080–6088, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v7112929>. Acesso em: 19 jan. 2023.

BARROS FILHO, I. R. *et al.* Soroprevalência de anticorpos para o vírus da leucose enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S. l.], n. 1991, p. 511–515, 2010. Disponível em: <http://www.quantitativeskills.com>. Acesso em: 19 jan. 2023.

BESSON, H.; BANKS, R.; BOFFETTA, P. Cancer mortality among butchers: A 24-state death certificate study. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 289–293, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.jom.0000184867.83288.d0>. Acesso em: 19 jan. 2023.

BUEHRING, G. C.; KRAMME, P. M.; SCHULTZ, R. D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. **Laboratory Investigation**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 359–365, 1994.

BUEHRING, Gertrude C. *et al.* Bovine leukemia virus discovered in human blood. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3891-9>. Acesso em: 22 jan. 2023.

BUEHRING, Gertrude C. *et al.* Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179367>. Acesso em: 22 jan. 2023.

BUEHRING, Gertrude Case *et al.* Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 772–782, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2005.131298>. Acesso em: 22 jan. 2023.

BUEHRING, Gertrude Case *et al.* Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1–13, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134304>. Acesso em: 22 jan. 2023.

BUEHRING, Gertrude Case; PHILPOTT, S. M.; CHOI, K. Y. Humans Have Antibodies Reactive with Bovine Leukemia Virus. **AIDS Research and Human Retroviruses**, [S. l.], v. 19, n. 12, p. 1105–1113, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/088922203771881202>. Acesso em: 22 jan. 2023.

BURNY, A. *et al.* Bovine Leukaemia: Facts and Hypotheses Derived from the Study of an Infectious Cancer. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 197–218, 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2847391/>. Acesso em: 22 jan. 2023.

CANOVA, R. *et al.* Bovine leukemia viral DNA found on human breast tissue is genetically related to the cattle virus. **One Health**, [S. l.], v. 13, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771421000422?via%3Dihub>. Acesso em: 22 jan. 2023

COFFIN, J. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: *Retroviridae* 2021. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 102, n. 12, 2021. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001712>. Acesso em: 22 jan. 2023.

CORREDOR-FIGUEROA, A. P. *et al.* Co-circulation of bovine leukemia virus haplotypes among humans, animals, and food products: New insights of its zoonotic potential. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 18, n. 9, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8124648/>. Acesso em: 22 jan. 2023.

DELARMELINA, E. *et al.* High positivity values for bovine leukemia virus in human breast cancer cases from Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 10, 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0239745>. Acesso em: 22 jan. 2023.

DIMITROV, P. *et al.* Pathological features of experimental bovine leukaemia viral (BLV) infection in rats and rabbits. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, [S. l.], v. 56, n. 2, p. 115–120, 2012. Disponível em: <https://sciendo.com/article/10.2478/v10213-012-0021-5>. Acesso em: 22 jan. 2023.

- FALLAHZADEH, H. *et al.* Red meat intake and risk of non-Hodgkin lymphoma: A meta-analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, [S. l.], v. 15, n. 23, p. 10421–10425, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25556486/>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- FARKAŠOVÁ, H. *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**, [S. l.], v. 114, n. 12, p. 3145–3150, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1621224114>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- FRANDOLOSO, R. *et al.* Prevalência de leucose enzoótica bovina, diarréia viral bovina, rinotraqueíte infecciosa bovina e neosporose bovina em 26 propriedades leiteiras da região nordeste do Rio Grande Do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 1102–1106, 2008. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/1398>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- FRIE, M. C. *et al.* Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S. l.], v. 182, p. 125–135, 1 dez. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165242716302239?via%3Dihub>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- GAUTAM, S. *et al.* Molecular characterization of bovine leukaemia virus (BLV) strains reveals existence of genotype 6 in cattle in India with evidence of a new subgenotype. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S. l.], v. 65, n. 6, p. 1968–1978, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.12979>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- GILLET, N. *et al.* Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, [S. l.], v. 4, p. 1–32, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- GILLET, N. A. *et al.* Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 10, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003687>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- GILLET, N. A.; WILLEMS, L. Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. **Retrovirology**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 75, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0308-3>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- GIOVANNA, M. *et al.* Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue. **Open Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 84–90, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/ojmm.2013.31013>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- GUTIÉRREZ, G. *et al.* Characterization of colostrum from dams of BLV endemic dairy herds. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 177, n. 3–4, p. 366–369, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.001>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- HAAS, L.; DIVERS, T.; CASEY, J. W. Bovine leukemia virus gene expression in vivo. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 66, n. 10, p. 6223–6225, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jvi.66.10.6223-6225.1992>. Acesso em: 22 jan. 2023.

HAMADA, R. *et al.* Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in egyptian dairy cattle. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 7, 10 set. 2020.

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**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 107–128, 1997.

HRON, T. *et al.* Remnants of an ancient Deltaretrovirus in the genomes of horseshoe bats (Rhinolophidae). **Viruses**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 185, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v10040185>. Acesso em: 22 jan. 2023.

HRON, T.; ELLEDER, D.; GIFFORD, R. J. Deltaretroviruses have circulated since at least the Paleogene and infected a broad range of mammalian species. **Retrovirology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 33, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0495-9>. Acesso em: 22 jan. 2023.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Dados e Números Sobre Câncer de Mama: Relatório anual 2022**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. 36 p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/relatorios/dados-e-numeros-sobre-cancer-de-mama-relatorio-anual-2022>. Acesso em: 19 jan. 2023.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Biological Agents. *In: IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. France: IARC, 2012. v. 100B. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/119>. Acesso em: 22 jan. 2023.

JAVIER PANEL, C. *et al.* Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV-CoCoMo-qPCR. **BMC Veterinary Research**, [S. l.], v. 9, 2013. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/95>. Acesso em: 22 jan. 2023.

JOHNSON, E. S. Cancer mortality in workers employed in cattle, pigs, and sheep slaughtering and processing plants. **Environment International**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 950–959, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.014>. Acesso em: 22 jan. 2023.

JULIARENA, M. A. *et al.* Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 99, n. 6, p. 4586–4589, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10480>. Acesso em: 22 jan. 2023.

KAZEMIMANESH, M. *et al.* Detection and molecular characterization of bovine leukemia virus in various regions of Iran. **Journal of General Virology**, [S. l.], v. 100, n. 9, p. 1315–1327, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31348000/>. Acesso em: 22 jan. 2023.

KHALILIAN, M.; HOSSEINI, S. M.; MADADGAR, O. Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 135, n. January, p. 103566, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103566>. Acesso em: 22 jan. 2023.

KHAN, Z. *et al.* Molecular investigation of possible relationships concerning bovine leukemia virus and breast cancer. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 12, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-08181-5>. Acesso em: 22 jan. 2023.

KONNAI, S. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 2163–2171, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.017>. Acesso em: 22 jan. 2023.

LAWSON, J. S. *et al.* Association of mouse mammary tumor virus with human breast cancer: Histology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction analyses. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 8, n. 141, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00141>. Acesso em: 22 jan. 2023.

LAWSON, J. S. *et al.* Mouse mammary tumor virus-like sequences in human breast cancer. **Cancer Research**, [S. l.], v. 70, n. 9, p. 3576–3585, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4160>. Acesso em: 22 jan. 2023.

LAWSON, J. S.; HENG, B. Viruses and breast cancer. **Cancers**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 752–772, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers2020752>. Acesso em: 22 jan. 2023.

LE, D. T. *et al.* Detection and genotyping of bovine leukemia virus (BLV) in Vietnamese cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, [S. l.], v. 82, n. 7, p. 1042–1050, 2020. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/82/7/82_20-0094/_article. Acesso em: 22 jan. 2023.

LEE, E. J. *et al.* Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. **Infection, Genetics and Evolution**, [S. l.], v. 41, p. 245–254, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27090024/>. Acesso em: 22 jan. 2023.

LEE, J. *et al.* Investigation of the bovine leukemia virus proviral DNA in human leukemias and lung cancers in Korea. **Journal of Korean Medical Science**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 603–606, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.3346/jkms.2005.20.4.603>. Acesso em: 22 jan. 2023.

LEE, L. C. *et al.* Bovine leukemia virus infection in a juvenile alpaca with multicentric lymphoma. **Canadian Veterinary Journal**, [S. l.], v. 53, n. 3, p. 283–286, 2012.

LENDEZ, P. A. *et al.* Bovine leukemia virus presence in breast tissue of Argentinian women. Its association with cell proliferation and prognosis markers. **Multidisciplinary Cancer Investigation**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 16–24, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.30699/acadpub.mci.4.16>. Acesso em: 28 out. 2022.

LIÉGEOIS, F. *et al.* Identification and molecular characterization of new STLV-1 and STLV-3 strains in wild-caught nonhuman primates in Cameroon. **Virology**, [S. l.], v. 371, n. 2, p. 405–417, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17976676/>. Acesso em: 22 jan. 2023.

- MA, J. G. *et al.* First report of bovine leukemia virus infection in yaks (*Bos mutus*) in China. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2016, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/9170167/>. Acesso em 22 jan. 2023.
- MAEZAWA, M.; INOKUMA, H. Analysis of bovine leukemia virus integration sites in cattle under 3 years old with enzootic bovine leukosis. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 165, n. 1, p. 179–183, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04431-6>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- MATOS, P. F. de; BIRGEL JÚNIOR, E. H.; BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre os resultados do teste de ELISA e da imunodifusão em gel de ágar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [S. l.], p. 171–179, 2005. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26428/28211>. Acesso em: 3 nov. 2020.
- MEAS, S. *et al.* Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. **Journal of Veterinary Medical Science**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 329–331, 2000. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/62/3/62_3_329/_article. Acesso em: 22 jan. 2023.
- MENDES, E. I. *et al.* Intercorrência entre leucose enzoótica e tuberculose em bovinos leiteiros do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 1–8, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p0012011>. Acesso em: 3 nov. 2020.
- MILLER, J. M. *et al.* Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 43, n. 6, p. 1297–1305, 1969. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/43.6.1297>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- MERIMI, M. *et al.* Complete suppression of viral gene expression is associated with the onset and progression of lymphoid malignancy: observations in Bovine Leukemia Virus-infected sheep. **Retrovirology**, [S. l.], v. 4, 2007. Disponível em: <https://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4690-4-51>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- MOE, K. K. *et al.* New evidence of bovine leukemia virus circulating in Myanmar cattle through epidemiological and molecular characterization. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 2, 2020. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0229126>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- MORATORIO, G. *et al.* Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 155, n. 4, p. 481–489, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-010-0606-3>. Acesso em: 22 jan. 2023.
- MORTON, W. E. Major differences in breast cancer risks among occupations. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 328–335, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00043764-199503000-00010>. Acesso em: 22 jan. 2023.

MURAKAMI, K. *et al.* The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 148, n. 1, p. 84–88, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20832956/>. Acesso em: 22 jan. 2023.

NEKOU EI, O. *et al.* Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, [S. l.], v. 133, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.09.011>. Acesso em: 22 jan. 2023.

OCHIRKHUU, N. *et al.* Detection of bovine leukemia virus and identification of its genotype in Mongolian cattle. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 161, n. 4, p. 985–991, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-015-2676-8>. Acesso em: 22 jan. 2023.

OLAYA-GALÁN, N. N. *et al.* Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. **Epidemiology and Infection**, [S. l.], v. 145, n. 15, p. 3125–3130, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0950268817002229>. Acesso em: 22 jan. 2023.

OLAYA-GALÁN, N. N. *et al.* Risk factor for breast cancer development under exposure to bovine leukemia virus in Colombian women: A case-control study. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 9, 2021. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0257492>. Acesso em: 22 jan. 2023.

OLAYA-GALÁN, N. N. *et al.* In vitro susceptibility of human cell lines infection by bovine leukemia virus. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 13, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.793348/full>. Acesso em: 22 jan. 2023.

OLSON, C. *et al.* Goat lymphosarcoma from bovine leukemia virus. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 67, n. 3, p. 671–675, 1981.

PANEI, C. J. *et al.* Study of horn flies as vectors of bovine leukemia virus. **Open Veterinary Journal**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 33–37, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6500860/>. Acesso em: 22 jan. 2023.

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**, [S. l.], v. 13, n. 1, 12 jan. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4709907/>. Acesso em: 22 jan. 2023.

POLAT, M.; TAKESHIMA, S. N.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology Journal**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–16, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0876-4>. Acesso em: 22 jan. 2023

ROBINSON, L. A. *et al.* Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 115, n. 4, p. 497–504, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.213>. Acesso em: 22 jan. 2023

RODAKIEWICZ, S. M. *et al.* Heterogeneity determination of bovine leukemia virus genome in Santa Catarina state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S. l.], v. 85, 2018.

Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/xhpSWQnMtYQdNBxfN79hXWj/?lang=en>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ROLA-ŁUSZCZAK, M. *et al.* The molecular characterization of bovine leukaemia virus isolates from Eastern Europe and Siberia and its impact on phylogeny. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 3, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058705>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ROLA-ŁUSZCZAK, M. *et al.* Molecular characterization of the env gene of bovine leukemia virus in cattle from Pakistan with NGS-based evidence of virus heterogeneity. **Pathogens**, [S. l.], v. 10, n. 7, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/7/910>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ROMERO, C. H.; CRUZ, G. B.; ROWE, C. A. Transmission of bovine leukaemia virus in milk. **Tropical Animal Health and Production**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 215–218, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02242060>. Acesso em: 22 jan. 2023.

RONIT, S.; SHOU-JIANG, G. Viruses and human cancer: from detection to causality. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 193, n. 1, p. 118–125, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.09.011>. Acesso em: 22 jan. 2023

ROSEWICK, N. *et al.* Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms15264>. Acesso em: 22 jan. 2023.

ROVNAK, J. *et al.* Isolation of bovine leukemia virus infected endothelial cells from cattle with persistent lymphocytosis. **Laboratory Investigation**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 192–202, 1991.

SAGATA, N. *et al.* Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 82, n. 3, p. 677–681, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.82.3.677>. Acesso em: 22 jan. 2023.

SAJIKI, Y. *et al.* Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load. **Journal of Veterinary Medical Science**, [S. l.], v. 79, n. 12, p. 2036–2039, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5745186/>. Acesso em: 22 jan. 2023.

SANDEV, N. *et al.* Influence of enzootic bovine leukosis virus upon the incidence of subclinical mastitis in cows at a different stage of infection. **Veterinarski Arhiv**, [S. l.], v. 74, n. 6, p. 411–416, 2004. Disponível em: <http://vetarhiv.vef.unizg.hr/papers/2004-74-6-1.pdf>. Acesso em: 22 jan. 2023.

SATO, H. *et al.* Overexpression of bovine leukemia virus receptor SLC7A1/CAT1 enhances cellular susceptibility to BLV infection on luminescence syncytium induction assay (LuSIA). **Virology Journal**, [S. l.], v. 17, 2020. Disponível em: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-020-01324-y>. Acesso em: 22 jan. 2023.

SCHWARTZ, I.; LÉVY, D. L. Pathobiology of bovine leukemia virus. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 521–536, 1994. Disponível em: <https://hal.science/hal-00902257/document>. Acesso em: 22 jan. 2023.

SCHWINGEL, D. *et al.* Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39834-7>. Acesso em: 22 jan. 2023.

TAGHADOSI, C. *et al.* Bovine Leukaemia Virus Tax Antigen Identification in Human Lymphoma Tissue: Possibility of onco-protein Gene T transmission. **Research in Molecular Medicine**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 25–32, 2019. Disponível em: <http://rmm.mazums.ac.ir/article-1-311-en.html>. Acesso em: 24 jan. 2023.

TAKEDA, S. *et al.* Genetic and epigenetic inactivation of TAX gene in adult t-cell leukemia cells. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 109, n. 4, p. 559–567, 2004. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.20007>. Acesso em: 24 jan. 2023.

VAHLENKAMP T. W.; CHOUDHURY B.; KUZMAK J. Enzootic bovine leukosis. *In*: OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Terrestrial Manual)**. 8th ed. [S.l.: s.n.], 2018. cap. 3. 4. 9, p. 1113–1124. Disponível em: <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 22 jan. 2023.

VIRUS, B. L. *et al.* Induction of Lymphosarcoma in Sheep by bovine leukemia virus. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 67, n. 5, p. 1157–1163, 1981.

WANG, M. *et al.* Molecular epidemiology and characterization of bovine leukemia virus in domestic yaks (*Bos grunniens*) on the Qinghai-Tibet Plateau, China. **Archives of Virology**, [S. l.] v. 163, n. 3, p. 659–670, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-017-3658-9>. Acesso em: 24 jan. 2023.

WANG, Y. *et al.* Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. **Cancer Research**, [S. l.], v. 55, n. 22, p. 5173–5179, 1995. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/55/22/5173/501901/Detection-of-Mammary-Tumor-Virus-ENV-Gene-like>. Acesso em: 24 jan. 2023.

WATANUKI, S. *et al.* Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 102, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0724-1>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WILLEMS, L. *et al.* Mutations in the bovine leukemia virus Tax protein can abrogate the long terminal repeat-directed transactivating activity without concomitant loss of transforming potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 89, n. 9, p. 3957–3961, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.89.9.3957>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WISE, L. A. *et al.* Exposure to breast milk in infancy and risk of breast cancer. **Cancer Causes and Control**, [S. l.], v. 20, n. 7, p. 1083–1090, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10552-009-9332-0>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WOLFE, N. D. *et al.* Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 102, n. 22, p. 7994–7999, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0501734102>. Acesso em: 22 jan. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Breast Cancer**. Geneva: WHO, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Acesso em: 19 jan. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Cancer Regional Profile 2020: Global**. Geneva: WHO, 2020a. Disponível em: <https://www.who.int/teams/noncommunicable-diseases/surveillance/data/cancer-profiles>. Acesso em: 19 jan. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Cancer Regional Profile 2020: AMRO (Americas Region)**. Geneva: WHO, 2020b. Disponível em: <https://www.who.int/teams/noncommunicable-diseases/surveillance/data/cancer-profiles>. Acesso em: 19 jan. 2023.

YAMANAKA, M. P. *et al.* No evidence of bovine leukemia virus proviral DNA and antibodies in human specimens from Japan. **Retrovirology**, [S. l.], v. 19, n. 7, 2022. Disponível em: <https://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12977-022-00592-6>. Acesso em: 24 jan. 2023.

YANG, Y. *et al.* Molecular characterization of bovine leukemia virus reveals existence of genotype 4 in Chinese dairy cattle. **Virology Journal**, [S. l.], v. 16, n. 108, 2019. Disponível em: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-019-1207-8>. Acesso em: 24 jan. 2023.

YU, C. *et al.* Genotyping bovine leukemia virus in dairy cattle of Heilongjiang, northeastern China. **BMC Veterinary Research**, [S. l.], v. 15, n. 179, 2019. Disponível em: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-019-1863-3>. Acesso em: 24 jan. 2023.

ZHANG, R. *et al.* Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. **Breast Cancer Research**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 16–18, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0763-8>. Acesso em: 22 jan. 2023