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

INVESTIGAÇÃO DO CARÁTER ZOONÓTICO DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA

Autora: Raíssa Canova
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

PORTO ALEGRE, 2021

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

INVESTIGAÇÃO DO CARÁTER ZOONÓTICO DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA

Autora: Raíssa Canova

Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária, subárea Medicina Veterinária Preventiva, especialidade Virologia.

Orientador: Cláudio Wageck Canal

PORTO ALEGRE, 2021

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

CIP - Catalogação na Publicação

Canova, Raíssa
Investigação do caráter zoonótico do vírus da leucose bovina / Raíssa Canova. -- 2021.
62 f.
Orientador: Cláudio Wageck Canal.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Virologia. 2. zoonose. 3. saúde única. I. Wageck Canal, Cláudio, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Raíssa Canova

INVESTIGAÇÃO DO CARÁTER ZOONÓTICO DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA

Aprovada em 26 de março de 2021.

APROVADA POR:

____
Dr. Cláudio Wageck Canal
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Orientador e Presidente da Comissão

____
Dr. Luiz Carlos Kreutz
Universidade de Passo Fundo
Membro da Comissão

____
Dra. Daisy Maria Strottmann
Instituto Carlos Chagas / Fiocruz-PR
Membro da Comissão

____
Dra. Juliana Felipetto Cargnelutti
Universidade Federal de Santa Maria
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais Maria Ester e Zeno, aos meus irmãos Alexandre e Augusto e a minha doguinha Honey.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo apoio, ajuda, aconselhamentos e incentivos para que fosse possível realizar o que me faz feliz.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Cláudio W. Canal, pela oportunidade, pelos conselhos e por acreditar nas minhas ideias. Foi muito importante para esta minha conquista!

Agradeço à toda equipe do laboratório Virovet pelo acolhimento, parceria, amizade e ensinamentos, em especial a Renata Budaszewski e ao Matheus Weber que estiveram sempre disponíveis para me ajudar.

Agradeço ao Hospital Moinhos de Vento por disponibilizar a realização desta pesquisa.

Agradeço aos meus amigos, por sempre terem me valorizado. Em especial à Kelli Zandoná e Natália Eichenberg por terem sido essenciais em tudo; e a Bibiana Barasuol, pelas longas conversas e discussões científicas.

Agradeço ao meu namorado Maurício, pelo apoio, incentivo, conselhos e suporte.

Agradeço às minhas vizinhas Arlete e Paola, pela amizade que se construiu e principalmente pelas marmitinhas de comida, sempre muito bem vindas!

Agradeço às agências financiadoras, por terem permitido o desenvolvimento deste trabalho e fornecido uma bolsa de estudos.

Muito obrigada!!

“Every new beginning

comes from some other beginning's end”

Semisonic – Closing time

Resumo

O câncer de mama é uma patologia que causa risco de vida e é um grande problema de saúde pública em todo mundo. No Brasil, o câncer de mama é responsável por quase 1/3 de todos os cânceres diagnosticados em mulheres e são necessários mais estudos para compreender melhor a etiopatogenia, profilaxia e novos tratamentos dessa doença mortal. Recentemente, vários estudos levantaram a possibilidade de que um retrovírus animal, o vírus da leucose bovina (BLV), causador da leucose enzoótica bovina (EBL), pudesse estar relacionado ao câncer de mama em mulheres. O BLV causa uma infecção silenciosa e geralmente negligenciada que, em alguns animais, evolui para linfocitose persistente e, por fim, para linfoma de células B. O vírus está disseminado na pecuária leiteira e o consumo de laticínios e de carne bovina é maior no Sul do Brasil, onde o estudo foi realizado, em comparação com outras regiões do país. O Capítulo 1 aborda a detecção de diferentes genes de BLV em tecido mamário de mulheres (saudáveis e com câncer) e de bovinos com EBL, e a comparação das sequências de nucleotídeos. É observado que eles são muito semelhantes, com uma identidade de nucleotídeos variando de 97,8 a 99,7% e que pertencem ao genótipo 1. Esse é o primeiro relato da presença do gene *env* de BLV em humanos. A detecção do provirus de BLV através de PCR se mostrou uma técnica eficaz, reforçando ainda mais a hipótese recente de que o BLV é um agente zoonótico, ampliando o conhecimento atual sobre a gama de hospedeiros do vírus. O Capítulo 2 aborda a detecção dos diferentes genes de BLV em tecido mamário fresco e em leucócitos humanos de pacientes com e sem câncer de mama. A análise estatística determinou um cálculo amostral de 218 espécimes. Desses, 25 foram analisados e todas as amostras foram negativas para os genes avaliados. O número pequeno de amostras analisadas pode ser a justificativa pela qual nenhuma amostra foi positiva até o momento. Este trabalho coloca em pauta a relação entre o BLV e o câncer de mama, colocando o vírus como alvo para novos estudos

Palavras-chave: vírus da leucose bovina, tecido mamário humano, zoonose, bovino, cancer de mama, genotipo 1

Abstract

Breast cancer is a life-threatening pathology and a major burden to public health worldwide. In Brazil, breast cancer accounts for almost 1/3 of all cancer diagnosed in women and more studies focusing on the etiopathogenesis, prophylaxis and novel treatments of this deadly condition are required. Recently, several studies raised the possibility that an animal retrovirus, the bovine leukemia virus (BLV), which causes enzootic bovine leukemia (EBL), could be related to breast cancer in women. BLV causes a silent and usualy neglected infection that in some animals evolves to persistent lymphocytosis and ultimately to B cell lymphoma. The virus is widespread on dairy cattle and the consumption of dairy-derived products and cattle meat is higher in South Brazil, where the study was conducted, compared to other regions of the country. Chapter 1 covers the detection of different BLV genes in breast tissue from women (healthy or with cancer) and from cattle with EBL, and the comparison of nucleotide sequences. It was observed that they are very similar, with a nucleotide identity ranging from 97.8 to 99.7% and belonging to genotype 1. This is the first report of the presence of the BLV *env* gene in humans. The detection of the BLV provirus through PCR has proven to be an effective technique, further reinforcing the recent hypothesis that BLV is a zoonotic agent, expanding the current knowledge about the host range of the virus. Chapter 2 addresses the detection of different BLV genes in fresh breast tissue and human leukocytes in patients with and without breast cancer. The statistical analysis determined a sample calculation of 218 specimens. Of these, 25 were analyzed and all samples were negative for the evaluated genes. The small number of samples analyzed may be the reason why no sample has been positive so far. This work highlights the relationship between BLV and breast cancer, placing the virus as a target for further studies.
Keywords: bovine leukemia virus, human breast tissue, zoonosis, cattle, breast cancer, genotype 1.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
oC	Graus Celsius
AGID	*Agar gel immunodiffusion*
AL	Aleuquêmicos
AP	*Adaptor protein*
BLV	Vírus da leucose bovina
BoLA	Antígeno de leucócitos bovinos
bp	Base pair
BRCA	*Breast cancer associated gene*
CA	Capsídeo
CD	*Cluster of differentiation*
CONEP	*National commission for ethic on research*
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleosídeo trifosfato
ds	*Double strand*
E	*Early*
EDTA	*Ethylene diamine tetra acetic acid*
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
EUA	Estados Unidos da América
FFPE	*Formalin fixed paraffin-embedded*
FAO	*Food and agriculture organization*
FBL	*Fetal bovine lung*
FEMAMA	Federação Brasileira de instituições filantrópicas de apoio à saúde da mama
FLK	*Fetal bovine kidney*
G	*Genotype*
GAPDH	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
Gp51	Glicoproteína
h	*Hour*

HER-2	*Human epidermal growth factor receptor 2*
HHV-4	*Human herpesvirus 4*
HPV	*Human papillomavirus*
INCA	Instituto nacional do câncer
Ig	Imunoglobulina
IS-PCR	*In situ* PCR
K2-I	Kimura
kg	Kilograma
KI-67	Antígeno de proliferação celular
LEB	Leucose enzoótica Bovina
LTR	*Long terminal repeat*
MA	Matriz
ML	*Maximum-likelihood*
MMTV	Vírus do tumor mamário de camundongos
NC	Nucleocapsídeo
ND	*Neutralizing domain*
ng	Nanograma
OMS	Organização mundial da saúde
pb	Pares de base
PBMC	*Peripheral blood mononuclear cells*
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	*Polymerase chain reaction*
PL	Linfocitose persistente
PTLV	Vírus linfotrópico de primatas
tRNA	RNA transportador
RNA	Ácido ribonucleico
RS	Rio Grande do Sul
SU	Superfície
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TE	Tris-EDTA
TM	Transmembrana
WHO	*World Health Organization*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

Em 2017, mais de 16.000 mulheres e 203 homens foram vítimas de câncer de mama no Brasil, sendo o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres no Sul, Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste do País, ficando atrás apenas do câncer de pele não-melanoma. As regiões Sul e Sudeste são as que apresentam as maiores taxas de óbito, ficando em 14,14 e 14,10 óbitos a cada 100.000 mulheres, respectivamente (INCA, 2019). Para 2020 são estimados mais de 66.000 novos casos de câncer de mama no Brasil, o que representa uma taxa de incidência de 43,74 casos a cada 100.000 mulheres (INCA,2020).

Estima-se que 12% dos casos de câncer em humanos sejam atribuídos a vírus, com altas porcentagens em países em desenvolvimento (OH; WEIDERPASS, 2014). No entanto, o aparecimento dos tumores é um resultado raro de infecção viral e pode ocorrer décadas após a infecção. É conhecido que a infecção por si só não é suficiente para o estabelecimento de neoplasias, pois os vírus agem, na maior parte das vezes, como iniciadores ou promotores da formação tumoral. Além disso, muitos vírus induzem o acúmulo de mutações, expressam oncoproteínas e modificam o ciclo celular (OH; WEIDERPASS, 2014; SARID; GAO, 2011).

Estudos recentes indicam que um retrovírus animal, conhecido como vírus da leucose bovina (BLV), agente etiológico da leucose enzoótica bovina (EBL), pode estar associado com a etiopatogenia do câncer de mama em humanos (BUEHRING et al., 2015a; CERIANI et al., 2018; SCHWINGEL et al., 2019). O BLV pertence ao gênero *Deltaretrovirus (*ordem *Ortervirales*, da família *Retroviridae* e subfamília *Orthoretrovirinae*) e é geneticamente relacionado com o vírus linfotrópico de primatas tipo 1 (PTLV-1), PTLV-2 e PTLV-3 (SAGATA et al., 1985). Nos bovinos o BLV infecta linfócitos B e se integra ao genoma do hospedeiro como um provírus (SCHWARTZ et al., 1994) e o desenvolvimento de linfoma está associado à baixa expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), o qual tem papel fundamental na resposta imunológica contra os vírus e esta baixa expressão é devido a polimorfismos na região promotora (KONNAI et al., 2006). Ainda, a presença do antígeno de leucócitos bovinos (BoLA) possui um papel importante na determinação da resposta imunológica e estabelecimento da infecção (JULIARENA et al., 2016) .

Interessantemente, verificou-se a presença de anticorpos contra o BLV em humanos e também uma associação no desenvolvimento de tumores mamários em mulheres, que se desenvolveram em células epiteliais e em células não-linfóides (BUEHRING et al., 2015, 2017). Contudo, a presença de anticorpos não prova que ocorreu uma infecção, mas prova que os seres humanos foram expostos ao vírus (BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003). Além disso, o DNA do BLV foi encontrado no sangue de mulheres nos Estados Unidos da América (EUA) (BUEHRING et al., 2019) e no Irã (KHALILIAN; HOSSEINI; MADADGAR, 2019), e no tecido mamário humano na Colômbia, sendo 19/53 (35%) positivo para câncer de mama e 24/53 (45%) negativo (GIOVANNA et al., 2013); Austrália, 40/50 (80%) com câncer e 19/46 (41%) sem câncer (BUEHRING et al., 2017); Argentina, 19/85 (22,4%) positivo para câncer e 25/63 (39,7%) negativo (CERIANI et al., 2018) e nos EUA: leste e sudeste, 67/ 114 (59%) positivos para câncer e 30/104 (29%) negativos para câncer (BUEHRING et al., 2015). No Brasil, existem dois estudos. O primeiro deles realizado no RS, o número de amostras positivas encontrada em tecido mamário com câncer foi de 22/72 (30,5%) enquanto que em tecido sem câncer foi 10/72 (13,9%) (SCHWINGEL et al., 2019). Já o estudo realizado em MG utilizou 88 amostras e em 47/49 (95.9%) das amostras tumorais foram positivas para BLV enquanto que 23/39 (59%) das amostras saudáveis foram positivas (DELARMELINA et al., 2020).

Até a presente data, nenhum estudo provou que a etiologia do câncer de mama pode ser resultado de uma infecção viral. Várias associações têm sido feitas, mas mais estudos são necessários para (a) elucidar qual é a frequência da presença do BLV na população de mulheres no Brasil; (b) analisar a identidade dos vírus encontrados em bovinos e seres humanos; (c) determinar qual é a forma de transmissão bovino-humano; (d) avaliar a possibilidade de transmissão humano-humano e assim trazer atenção para este vírus que é frequentemente negligenciado dentro dos rebanhos bovinos.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Câncer de mama

O câncer de mama afeta cerca de 2,1 milhões de mulheres por ano em todo o mundo, sendo o câncer mais comum em mulheres e também o responsável pelo maior número de mortes relacionadas ao câncer (WHO, 2019). Dados mundiais indicam que em 2013 houve 1,8 milhão de casos com 464 mil mortes e a prevalência em países subdesenvolvidos (63%) foi maior do que em países desenvolvidos (37%). A maior incidência ocorre no norte da Europa, enquanto a menor se dá no leste asiático (FITZMAURICE et al., 2015). Quando analisadas as taxas de mortalidade relacionadas ao câncer de mama em mulheres de 1980 até 2016, foi evidenciado um aumento de 33,6% nos 35 anos de observação. Essa tendência de aumento é verificada em todas as regiões do Brasil, sendo que Sul e Sudeste apresentam os valores mais elevados (INCA, 2019).

As neoplasias malignas de mama são vistas como uma doença heterogênea, tanto pela evolução clínica e fatores de risco, quanto pela morfologia. Nesse quesito, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publica periodicamente classificações para uniformização mundial da terminologia. Com relação aos subtipos, existem os histológicos e os moleculares. Em relação aos subtipos histológicos, eles são classificados com base no tamanho, na forma e na disposição celular do tumor, e existem, pelo menos, vinte e um tipos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). A mais recente publicação data de 2012, na qual o subtipo mais comum, anteriormente chamado de carcinoma ductal invasivo, passou a ser denominado carcinoma invasivo do tipo não especial. Tal subtipo, originado no epitélio ductal da mama, representa entre 65% e 85% dos casos de câncer de mama invasivo (WHO, 2012). Esse tipo de carcinoma, iniciando-se nos ductos de leite pode avançar nos tecidos adjacentes, além de possuir pelo menos um receptor hormonal na superfície das suas células (FEMAMA, 2018). Os subtipos moleculares são determinados pela análise da expressão gênica, a qual é predita de forma aproximada através de processos rotineiros de imunohistoquímica para avaliação de marcadores biológicos. São avaliadas as expressões dos receptores hormonais (estrogênio/progesterona), o índice proliferativo celular (KI-67) e a superexpressão do gene do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). A presença ou não de receptores hormonais determinam o potencial de crescimento do tumor; a expressão da proteína HER2, por sua vez, determina a intensidade da divisão celular (FEMAMA, 2018). O BRCA1 e BRCA2 (*Breast cancer associated gene*) são dois anti-oncogenes e mutações nesses genes também indicam o aumento do risco de se desenvolver câncer de mama (SUN et al., 2017). Existem quatro subtipos moleculares: luminal A (HR+/HER2-), o mais comum, que tende a ter crescimento lento e ser menos agressivo do que os outros subtipos e a estar associado com os prognósticos mais favoráveis por ser responsivo a terapias hormonais; o luminal B (HR+/HER2+), o qual foi originalmente caracterizado como sempre sendo positivo para HER2, mas atualmente foi constatado como sendo altamente positivo para HER2 e/ou para a proteína Ki67, e tem prognóstico pior do que o luminal A; o basal-like (HR-/HER2-), também chamado de triplo-negativo (ER-, PR- e HER2-), tendo o pior prognóstico entre todos os subtipos, pois os métodos de tratamento não avançaram tanto para ele quanto para os outros; e o HER2-enriched (HR-/HER2+), que, no passado, tinha o pior prognóstico. No entanto, o uso disseminado de terapias específicas para esse subtipo melhorou significativamente o resultado das pacientes. A avaliação do subtipo molecular é muito importante para predição da resposta a terapias específicas e do prognóstico da doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

A etiologia do câncer de mama depende de vários fatores de risco que incluem aspectos biológicos (fatores endócrinos, genéticos e hereditários), histórico reprodutivo, comportamento e estilo de vida (consumo de álcool e cigarro, má nutrição, falta de exercício), níveis altos de hormônios endógenos pré ou pós-menopausa; uso recente de contraceptivos hormonais; uso recente e prolongado de terapia hormonal na menopausa entre outros (CAMPEAU; FOULKES; TISCHKOWITZ, 2008; AMERICAN CANCER SOCIETY). Os hormônios femininos têm papel de destaque na etiologia do câncer de mama e, consequentemente, a idade é um dos mais importantes fatores de risco, com taxas em ascendência até os 50 anos, associada à nuliparidade e à primeira gestação após os 30 anos. Contrariamente, a amamentação está associada a um menor risco de desenvolvimento de carcinomas mamários (WORLD CANCER RESEARCH FUND, 2007).

1.2 Vírus e câncer em humanos

Atualmente, sete vírus são classificados no Grupo 1 de carcinogênicos para humanos pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC): vírus Epstein Barr (EBV), associado ao Linfoma de Burkitt e ao carcinoma nasofaringeal; vírus da hepatite B (HBV) e da hepatite C (HCV), associados a carcinoma hepatocelular; papilomavírus humano (HPV), especificamente os tipos 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, ,52, 56, 58 e 59, associados ao câncer cervical; vírus linfotrópico de células T humano tipo 1 (HTLV-1), associado a leucemia e linfoma; herpesvírus humano 8 (HHV-8), associado ao sarcoma de Kaposi; e vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), associado direta ou indiretamente, a diversos tipos de câncer (IARC, 2012). O HBV, o HCV e o HPV, junto com a bactéria *Helicobacter pilori*, são responsáveis por mais de 90% dos cânceres infecciosos no mundo (DE MARTEL et al., 2012). Globalmente, estima-se que 16% de todos os casos de câncer em humanos possuem um agente infeccioso envolvido (DE MARTEL et al., 2012), sendo 12% atribuídos aos vírus (OH; WEIDERPASS, 2014). No entanto, o aparecimento dos tumores é um resultado raro de infecção viral e pode ocorrer décadas após a infecção. Muitos vírus se aproveitam de uma condição de divisão celular exagerada para facilitar sua infecção e disseminação pelos tecidos, expressando oncoproteínas que modificam o ciclo da célula (OH; WEIDERPASS, 2014; SARID; GAO, 2011).

Há diversos estudos tentando demonstrar/relacionar os vírus como responsáveis pela formação de carcinomas mamários. No entanto, há muita controvérsia e os estudos divergem em diferentes aspectos, pois dependem do tipo de amostra, tipo de análise (PCR, sorologia, isolamento, etc.), preparo das amostras e recursos laboratoriais (GANNON et al., 2018). Na década de 1930, foi observada em camundongos uma forma de transmissão de tumores mamários por meio da alimentação com leite materno. O que hoje sabemos se tratar do vírus do tumor mamário de camundongos (MMTV – *Mouse mammary tumor virus*), antes era chamado de "fator tumoral". O MMTV é um retrovírus pertencente ao gênero *Betaretrovirus* (BITTNER, 1935). Ainda, o HPV possui proteínas oncogênicas, como a E6 e E7, que predispõem ao desenvolvimento de carcinomas. No Brasil, o HPV esteve presente em 49,5% das amostras de carcinoma mamário e em 15,8% das amostras teciduais normais (CAVALCANTE et al., 2018). O herpesvírus tipo 4 (HHV-4) está associado ao desenvolvimento de carcinomas nasofaringeais, câncer gástrico e, recentemente, a detecção do DNA em tecidos mamários cancerígenos foi observada em até 68% dos casos. Nos últimos anos, estudos utilizando testes sorológicos e moleculares ao redor do mundo (BALTZELL et al., 2018; BUEHRING et al., 2015, 2019; BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003; BUEHRING; CHOI; JENSEN, 2014; CERIANI et al., 2018; KHALILIAN; HOSSEINI; MADADGAR, 2019; SCHWINGEL et al., 2019) têm evidenciado o papel do vírus da leucose bovina no desenvolvimento do câncer do mama. A frequência de detecção dos vírus varia conforme a localizacão geográfica, a amostra, protocolos de detecção, e a carga viral pode ser um fator determinante para a detecção dos vírus nos tecidos (GANNON et al., 2018).

1.3 BLV em humanos

O potencial zoonótico do BLV começou a ser levado em consideração na década de 60. Os seres humanos, ao domesticarem bovinos, acabaram por estabelecer um contato íntimo com os animais, e o fato da transmissão entre animais ser principalmente pela via horizontal – por meio de técnicas de manejo, como a descorna, vacinação, etc. – levantou-se a possibilidade de o vírus ter caráter zoonótico (BURRIDGE et al., 1981). Devido à falta de testes de diagnóstico mais específicos e sensíveis, acreditou-se, por muitos anos, que “o BLV não é transmitido para humanos e nenhuma doença humana jamais foi atribuída ao BLV” (BURRIDGE, 1981). Após, constatou-se que o BLV pode ser encontrado no leite de vacas infectadas (FERRER; KENYON; GUPTA, 1981), e utilizando testes sorológicos mais sensíveis, foi também possível detectar em 74% das amostras humanas a presença de, pelo menos, um isotipo de imunoglobulina (IgG1, IgM, IgA e IgG4) (BUEHRING et al., 2003). Ao longo dos anos, diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo inciaram a pesquisa do DNA proviral em tecido mamário com e sem câncer. Foram utilizadas as técnicas de PCR convencional e PCR *in situ* (Figura 1), tendo como alvos as regiões *env, gag, tax*, e *LTR* (CERIANI et al., 2017; BUEHRING et al., 2015, 2017, 2019; BUEHRING; CHOI; JENSEN, 2014; GIOVANNA et al., 2013; KHALILIAN; HOSSEINI; MADADGAR, 2019; SCHWINGEL et al., 2019), além da técnica de imunohistoquímica (BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003). No Brasil, um estudo pioneiro realizado no RS testou 144 amostras de tecido mamário fixo parafinado, divididas em 72 amostras de tecido mamário sem câncer e 72 amostras com diferentes graus de malignidade. A PCR para o gene *tax* foi positiva em 30,5% das amostras teciduais com câncer, mas também em

13,9% dos tecidos sem câncer, obtendo um odds ratio 2,73 (SCHWINGEL et al., 2019). Em outro estudo realizado em Minas Gerais e utilizando um total de 88 amostras revelou-se que 95,9% (47/49) de tecido mamário com câncer e 59% (23/39) sem câncer foram positivos para BLV (DELARMELINA et al., 2020). Ainda, duas meta-análises verficaram a forte associação entre a infecção por BLV e o risco de desenvolver câncer de mama (GAO; KOUZNETSOVA; TSIGELNY, 2020; KHATAMI et al., 2020). Todos os estudos utilizaram amostras de tecido parafinado fixo, contudo, os reagentes utilizados podem causar danos ao DNA, levando a uma falha na detecção do DNA proviral, podendo ser subestimado o número de positivos.

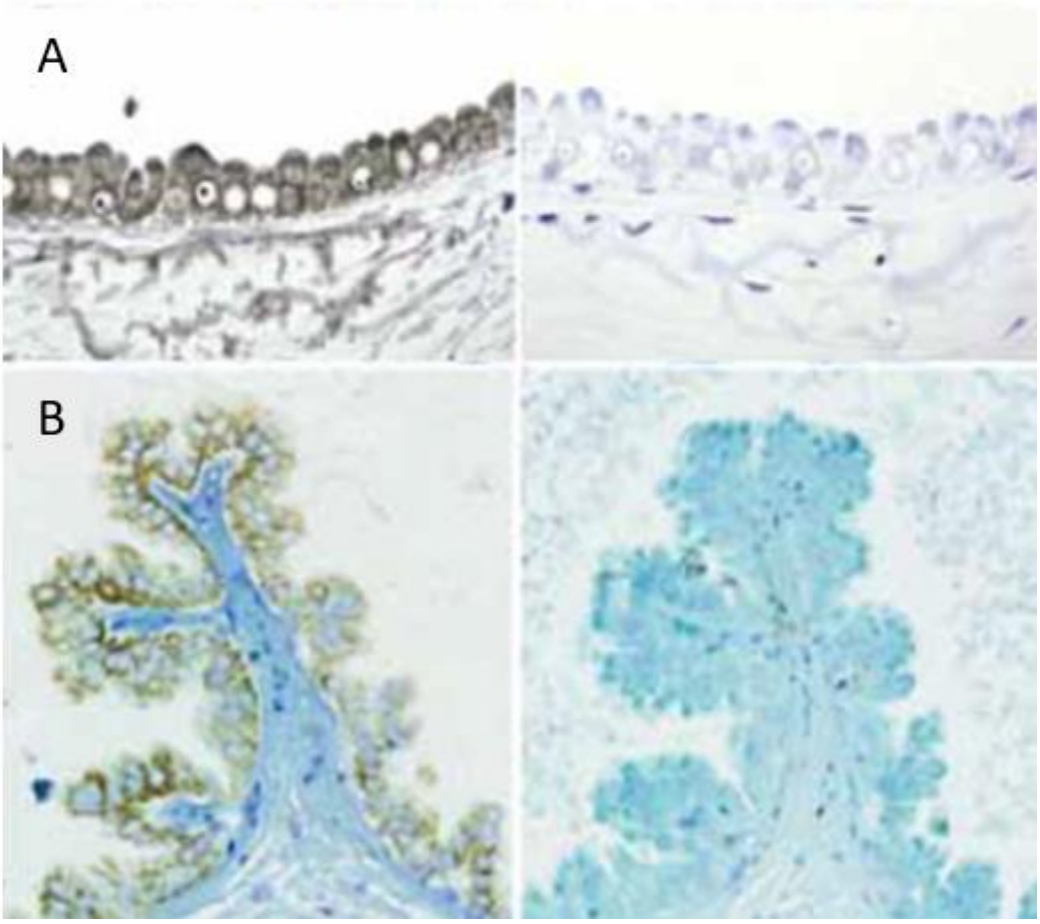

Figura 1. Resultados da *IS-PCR* para um fragmento do gene *tax* e da imunohistoquímica para o antígeno p24 do BLV em amostras de tecido mamário de mulheres A. à esquerda, amplificação bem sucedida de um fragmento do gene *tax* do BLV por IS-PCR dentro das células epiteliais mamárias de uma paciente, evidenciada pela cor marrom escura; à direita, ausência de amplificação na mesma amostra devido à ausência de primers na reação; 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, mostrando que o resultado não foi falso positivo em virtude de fatores inerentes ao tecido.
Fonte: Adaptado de Buehring et al., 2014.

1.4 Vírus da leucose bovina

1.4.1 Biologia e classificação

A família *Retroviridae* pertence à ordem *Ortervirales* a qual é dividida nas duas subfamílias *Orthoretrovirinae* e *Spumaretrovirinae*, que compreendem 11 gêneros e 68 espécies. Os retrovírus são esféricos, envelopados e possuem entre 80 e 100 nanômetros de diâmetro (ICTV, 2011). O BLV pertence ao gênero *Deltaretrovirus,* o qual é composto por quatro espécies virais que compartilham muitas similaridades entre elas: o

BLV e os vírus T-linfotrópicos de primatas tipos 1, 2 e 3 (PTLV-1, 2 e 3). As três espécies de PTLV são também chamados de vírus T-linfotrópicos de humanos (HTLV-1, 2 e 3), quando encontrados em humanos ou de vírus T-linfotrópicos de símios (STLV-1, 2 e 3), quando encontrados em primatas não humanos (WOLFE et al., 2005). Atualmente, não existem *Deltaretrovirus* endógenos reconhecidos (ICTV, 2011). No entanto, artigos recentes têm relatado a descoberta de possíveis vírus endógenos em morcegos (FARKAŠOVÁ et al., 2017; HRON et al., 2018) e outras espécies de mamíferos (HRON; ELLEDER; GIFFORD, 2019).

1.4.2 Genoma e proteínas virais

O genoma dos *Deltaretrovirus* é formado por duas moléculas idênticas de RNA fita simples, linear e de polaridade positiva. Cada fita possui, aproximadamente, 8,3 quilobase e é associada a uma molécula de RNA transportador (tRNA) perto da extremidade 5’ que funciona como iniciador no momento da transcrição reversa (ICTV, 2011). Assim como os outros retrovírus, eles possuem quatro genes principais que codificam as proteínas estruturais e as enzimas virais: *gag, pro, pol* e *env* (ICTV, 2011). Os membros do gênero *Deltaretrovirus* também contêm genes regulatórios relacionados a proteínas não estruturais importantes para a expressão gênica e a replicação viral, denominadas *tax* e *rex* (ICTV, 2011). O BLV ainda codifica micro-RNAs (miRNAs) e duas proteínas acessórias *R3* e *G4* (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). O genoma é flanqueado nas extremidades por duas regiões iguais chamadas de repetições terminais longas (LTRs), formadas por três partes consecutivas denominadas U3, R e U5 (Figura 2). Na LTR 5’, a região U3 inclui sequências regulatórias da transcrição, e na LTR 3’, a região U3 inclui os sinais de poliadenilação (SCHWARTZ; LÉVY, 1994).

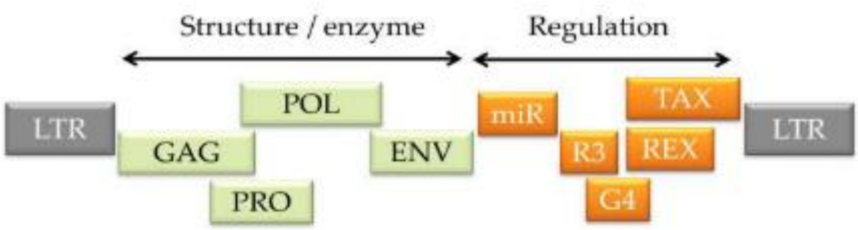

Figura 2 – Representação esquemática da estutura e organização genômica dos *Deltaretrovírus*. Adaptado de BAREZ et al., 2015

Após a transcrição, um mRNA compreendendo todo o genoma serve para tradução 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. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais internas e não glicosiladas da matriz (MA – p15), do capsídeo (CA – p24) e do nucleocapsídeo (NC – p12) (ICTV, 2011; SCHWARTZ; LÉVY, 1994). 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 (PEARL; TAYLO et al., 1987; SCHWARTZ; LÉVY, 1994). As proteínas p24 e gp51 têm sido utilizadas associadas ou isoladas para o desenvolvimento de testes de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e imunodifusão em gel de agar (AGID) (ANDREOLLA et al., 2018b; BAREZ et al., 2015) por serem imunogênicas e alvos do sistema imune. O gene *pro* codifica a protease viral, responsável por clivar os precursores *gag, pro, pol* e *env* e originar as proteínas maduras (PEARL; TAYLO et al., 1987; SCHWARTZ; LÉVY, 1994), e o gene *pol* codifica a transcriptase reversa (RT), que possui atividade de DNA polimerase dependente de RNA na porção N-terminal e de integrase (IN) (BURNY et al., 1988; 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) (ICTV, 2011; SCHWARTZ; LÉVY, 1994). 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 (AIDA et al., 2013; SCHWARTZ et al., 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* (SCHWARTZ; LÉVY, 1994). A *tax* tem a função de estimular o início da transcrição a partir da região U3 da LTR 5’ e *Rex* é responsável pela regulação da expressão viral através do controle pós-transcrição. 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 (ROSEWICK et al., 2013; POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Eles interagem com proteínas importantes no processo de silenciamento de RNA e mimetizam componentes celulares (BAREZ et al., 2015).

1.4.3 Replicação viral

A entrada na célula hospedeira é mediada pela interação entre a gp51 e o complexo de proteínas adaptadoras, as quais acredita-se serem os receptores específicos na célula hospedeira, resultando em fusão do envelope viral com a membrana plasmática (SUZUKI et al., 2003). A replicação começa com a transcrição reversa do RNA do vírion em cDNA, usando o tRNA como iniciador 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. O produto dessa hidrólise serve como iniciador para síntese da fita de cDNA de sentido positivo a partir da cópia de sentido negativo. O DNA retroviral se integra no DNA cromossomal do hospedeiro por um mecanismo envolvendo a IN, formando um provírus. O provírus integrado é transcrito pela RNA polimerase II da célula infectada mediante o papel da *tax* e os sinais transcricionais na LTR 5’ (ICTV, 2011).

O BLV pode replicar tanto pela formação de vírions descendentes, o que acontece em menor grau, como pela divisão mitótica das células portadoras do provírus (expansão clonal dos linfócitos B), o que acontece em maior grau. A inserção do BLV no genoma celular no estágio inicial da infecção favorece regiões promotoras, principalmente em animais com menos de três anos de idade (MAEZAWA; INOKUMA, 2020). Porém, células com alta atividade gênica são alvo do sistema imune do hospedeiro e são eliminadas, o que favorece a sobrevivência de células com baixa atividade gênica (GILLET et al., 2013). Consequentemente, a transcrição do genoma do BLV ocorre raramente nos linfócitos infectados, sendo que o mRNA viral é detectado em uma a cada 50 mil células (RADKE et al., 1992; 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* (GILLET et al., 2007). Os genes *gag*, *pol* e *env* são frequentemente deletados durante a progressão da doença, provavelmente como uma forma de escapar 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 cepas em comparação à *tax* (GILLET et al., 2007).

1.4.4 Genótipos virais

Para a classificação dos vírus em genótipos, a região do gene *env* que codifica a gp51 tem sido amplamente utilizada na realização de análises filogenéticas do BLV devido às suas importantes funções biológicas (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017), além de ser um dos principais alvos dos anticorpos neutralizantes (PORTETELLE et al., 1989; POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Atualmente, são descritos dez genótipos do BLV baseados em sequências parciais ou totais da região genômica da gp51, nomeados de genótipo-1 (G1) até genótipo-10 (G10) (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). O G1 é o mais prevalente e é distribuído em quase todos os continentes (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). No Brasil, os genótipos 1, 2, 5, 6 e 7 já foram detectados (GAETA et al., 2017; POLAT et al., 2016a).

1.4.5 Prevalência

O BLV é amplamente distribuído em todo o mundo. Nos EUA, 84% dos bovinos leiteiros e 39% dos bovinos de corte são soropositivos (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). No Brasil, a prevalência varia de acordo com a região em que o estudo foi realizado. Em Pernambuco, por exemplo, a prevalência de anticorpos contra o BLV foi de 23,1% (MENDES et al., 2011), enquanto que no Rio Grande do Sul (RS) é de 60% (FRANDOLOSO et al., 2008). Recentemente, na região norte do RS foram encontradas prevalências de 31,1% e 9,5% em bovinos de leite e de corte, respectivamente (ANDREOLLA et al., 2018). No Paraná e na Bahia, a prevalência é de cerca de 56,3% (FILHO et al., 2010) e 41% (MATOS; BIRGEL JÚNIOR; BIRGEL, 2005), respectivamente. Embora a prevalência seja alta, a leucose clínica se desenvolve em somente 5% dos animais, o que os leva a morte ou descarte do rebanho. Alguns países da Europa implementaram programas de erradicação do vírus durante o século XX como Dinamarca, Finlândia, Suíça e Holanda, e, atualmente, são considerados livres de BLV (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Ainda, programas de erradicação incentivados pelo governo Australiano em 1997 permitiu que em 2012 o país fosse declarado livre de BLV em seus rebanhos (BUEHRING et al., 2017).

1.4.6 Leucose enzoótica bovina

A infecção pelo BLV pode se manifestar de três maneiras distintas em bovinos: (1) animais clinicamente assintomáticos, chamados aleuquêmicos (AL); (2) animais com linfocitose persistente (PL) e, mais raramente; (3) animais com linfomas de células B (PANEI et al., 2013). Após 3 a 5 anos, aproximadamente 5% dos animais desenvolvem linfoma de células B e são descartados do rebanho, enquanto que os outros 95% permanecem assintomáticos, podendo seus produtos (carne e leite) chegar à mesa do consumidor contaminados (BURNY et al., 1988). A porcentagem de animais com linfocitose persistente (a qual se caracteriza por uma expansão clonal de linfócitos B) varia de 30% a 70% e somente 0,1% a 10% dos animais desenvolvem tumores (LEONEL, 2018). A viremia em bovinos é detectável apenas durante as primeiras duas semanas de infecção (PORTETELLE et al., 1978; SCHWARTZ; LÉVY, 1994). Os sinais clínicos variam conforme a localização dos tumores, podendo-se visualizar desde sinais gástricos até neurológicos (LEONEL, 2018). O curso da doença pode estar relacionado também ao local de inserção do provírus (DNA retrotranscrito) no genoma do hospedeiro. Em estudo recente, foi observado que em bovinos jovens (com menos de 3 anos de idade) os sítios de inserção do provírus diferiram dos animais com mais de 3 anos, e essa pode ser a causa do estabelecimento da doença naqueles animais (MAEZAWA; INOKUMA, 2019).

O BLV pode ser isolado por meio de cultivo *in vitro* das células de sangue periférico (PBMC – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) e de tumores, sendo possível observar a formação de sincícios após 3 a 4 dias de cultivo em células FLK (*Fetal Lamb Kidney*) ou FBL (*Fetal Bovine Lung*) (GHUSDAEL et al., 1984; LEONEL, 2018). Ainda, os genes *env, gag, pol, tax* e *LTR* são alvos para o desenvolvimento de testes de diagnóstico visando à detecção do material genético do vírus no sangue e nos tecidos. Os testes sorológicos, como ELISA, AGID, soroneutralização e hemaglutinação são utilizados para fazer a detecção de anticorpos contra BLV (GHUSDAEL et al., 1984) e utilizam como antígeno, principalmente, as proteínas do envelope (gp51) e capsídeo (p24) (BAREZ et al., 2015).

A infecção natural pelo BLV ocorre principalmente em bovinos, mas búfalos e capivaras também são suscetíveis (SCHWARTZ et al., 1994). Ainda, ovelhas desenvolvem tumores ao serem infectadas experimentalmente (SCHWARTZ et al., 1994), enquanto que coelhos, ratos, porquinhos-da-índia, gatos, cães, macaco *rhesus*, antílopes, cabras e seres humaos podem apresentar anticorpos para BLV (LEONEL, 2018).

Este trabalho propõe obter informações sobre a relação da presença do BLV e a ocorrência do câncer de mama em amostras de tecido fixo parafinado e também de amostras de tecido fresco (coletado em cirurgia e levado ao laboratório) e de sangue. A obtenção de dados relacionados a frequência de detecção do material genético em tecido mamário fresco e isolamento do vírus em cultivo celular, são estudos que, até a presente data, nunca foram realizados. A detecção do RNA viral e o isolamento do vírus no tecido mamário e/ou sangue será um indicativo de que o mesmo tem capacidade de replicação e a transmissão entre humanos poderá ocorrer e facilitar a disseminação do vírus na população, fazendo do BLV um problema de saúde pública, enfatizando a necessidade de implementação de medidas de controle e eliminação do BLV dos rebanhos.

2 CAPÍTULOS

2.1 Capítulo 1: Pesquisa da relação dos genótipos do BLV encontrados no RS com os genótipos encontrados em seres humanos.

O presente experimento já foi concluído e um artigo científico de nome *Bovine leukemia viral DNA found on human breast tissue is genetically related to the cattle virus* foi redigido e publicado no periódico *One Health Journal* com fator de impacto 4.694.

One Health 13 (2021) 100252

Contents lists available at ScienceDirect

One Health

journal homepage: www.elsevier.com/locate/onehlt

Bovine leukemia viral DNA found on human breast tissue is genetically related to the cattle virus

Raíssa Canova [a], Matheus N. Weber [a], Renata F. Budaszewski [a], Mariana S. da Silva [a], Daniela Schwingel [b], Cláudio W. Canal [a], Luiz C. Kreutz [c,*]

[a] Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil
[b] Faculdade Meridional (IMED), Passo Fundo, RS, Brazil
[c] Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Bovine leukemia viral DNA
Human breast tissue
Zoonosis
Cattle
Human

ABSTRACT

Bovine leukemia virus (BLV) infection is widespread in cattle and associated with B cell lymphoma. In a previous study we demonstrated that bovine leukemia viral DNA was detected in human breast tissues and significantly associated with breast cancer. Our current study aimed to determine whether BLV DNA found in humans and cattle at the same geographical region were genetically related. DNA was extracted from the breast tissue of healthy ($n = 32$) or cancerous women patients ($n = 27$) and from the blood ($n = 30$) of cattle naturally infected with BLV, followed by PCR-amplification and partial nucleotide sequencing of the BLV *env* gene. We found that the nucleotide sequence identity between BLV *env* gene fragments obtained from human breast tissue and cattle blood ranged from 97.8 to 99.7% and grouped into genotype 1. Thus, our results further support the hypothesis that this virus might cause a zoonotic infection.

1. Introduction

Bovine leukemia virus (BLV) is the causative agent of Enzootic Bovine Leukosis (EBL), a silent lifelong infection of cattle. BLV belongs to the genus *Deltaretrovirus* (order *Ortervirales*, family *Retroviridae*, subfamily *Orthoretrovirinae*) and is genetically related to the primate T-cell leukemia virus type 1 (PTLV-1), PTLV-2 and PTLV-3 [1]. In cattle, BLV infects B-lymphocytes causing polyclonal proliferation of CD5+ cells [2]; however, progression to B cell lymphoma occurs in less than 5% of the infected animals and is characterized by modified B-lymphocyte infiltrates in different organs including lymph nodes, heart, kidney, liver, uterus, eye and udder [3].

As a retrovirus, the BLV genome encodes the *gag*, *pol* and *env* genes and two identical long terminal repeat chains (LTRs) at the 5′and 3′ ends of the genome [4]. The *gag* and *pol* genes encode for structural proteins and viral enzymes [4]. The *env* gene encodes a highly variable viral envelope glycoprotein (gp51) and a conserved transmembrane protein (gp30). The gp51 is involved in receptor recognition and virus attachment to the host cell [5] and, as such, is a major determinant of viral host range. Because of its heterogeneity, the *env* gene is also used for genotyping studies and recent phylogenetic analysis indicated that BLV could be classified into 10 genotypes [6]. This classification contributes to a better understanding of BLV epidemiology, genetic diversity, and should help to study virus evolution and its role as a possible zoonotic agent.

During natural infection in cattle, BLV is found more abundantly in mammary epithelium than in lymphocytes [7] suggesting that colostrum and milk might be a source of infection to newborn calves and possibly to milk consumer. However, early studies performed in the 1980's using the detection tests available at that time concluded that there was "no epidemiological or serological evidence that BLV could infect humans" [8]. Nonetheless, because anti-BLV antibodies have been detected in humans, that theory is now contested [9]. In addition, several studies indicated that BLV DNA might be found in the breast tissue of women from different regions of the world including Colombia [10], USA [11,12], Australia [13], Argentina [14], Brazil [15] and Iran [16]. Furthermore, BLV DNA was also detected in buffy coat cells of blood specimens from females patients in United States [17] and Iran [16].

Viruses promote changes in the cell cycle and/or cell morphology

* Corresponding author at: Laboratório de Microbiologia e Imunologia Avançada, Universidade de Passo Fundo, Prédio G3, Campus I, Rodovia BR 285, Km 292, Bairro São José, 99052-900 Passo Fundo, RS, Brazil.
E-mail address: lckreutz@upf.br (L.C. Kreutz).

https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100252
Received 8 November 2020; Received in revised form 16 April 2021; Accepted 18 April 2021
Available online 20 April 2021
2352-7714/

and some viruses are implicated in the development of certain types of cancer, including breast cancer [18]. In humans, breast cancer is a heterogeneous disease characterized by changes in the cellular epithelium and the non-special invasive carcinoma is the most common histological subtype [19]; it originates in the ductal epithelium and accounts for by 65 to 85% of all invasive breast cancer [19]. Worldwide, breast cancer affects approximately 2.1 million women a year and it is considered the most common type of female cancer with the highest number of cancer-related deaths [20]. In 2018, for instance, there were 627 thousand breast cancer related deaths which accounts for approximately 15% of all cancer deaths amongst women [20]. The findings linking BLV DNA to breast cancer in women represents an additional challenge that should be thoroughly investigated. Here, our aim was to determine whether BLV DNA found in women breast tissue and in cattle at the same geographical region and time span period were genetically related.

2. Materials and methods

2.1. Human samples

A total of 59 formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) mammary tissue samples were used in this study. All the samples were collected from women in Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. Briefly, breast tissues were surgically removed from healthy women submitted to breast reduction surgery ($N = 32$) or women diagnosed with invasive breast cancer submitted to mastectomy or breast segmentectomy ($N = 27$). These samples were subsequently fixed with 10% buffered formalin for 24–36 h and then embedded in paraffin blocks, sectioned (5 μm thick) and dried at −70 °C for 30 min and then mounted on glass microscopic slides for histopathologic and immunohistochemistry diagnosis of breast cancer.

The study was approved by the Committee on Research Ethics (protocol # 2.247.462) of the Universidade de Passo Fundo, and the procedures used conformed to the tenets of the National Commission for Ethic on Research (CONEP) of the Brazilian Ministry of Health.

2.2. Bovine samples

Blood samples were obtained from 30 animals with clinical signs consistent with EBL at different farms in Rio Grande do Sul, southern Brazil. Briefly, 5 mL of blood was collected by veterinarians in EDTA tubes (ethylene diamine tetra acetic acid) and kept refrigerated until reaching the Veterinary Virology Laboratory at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, centrifuged (500 ×g, 10 min) to obtain the plasma and buffy coat cells that were then transferred to new tubes and frozen at -20 °C until analysis. The presence of BLV in the animals was confirmed by PCR for the *env* gene and further confirmed by Sanger sequencing.

2.3. DNA isolation

The proviral DNA isolation of paraffin-embedded tissue was performed selecting areas with larger amounts of epithelial tissue cells. In brief, the DNA was isolated from deparaffinized tissue using RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Ambion, Austin, TX, USA). For cattle blood, DNA was extracted from the buffy coat layer cells using a standard Phenol–chloroform protocol [21].

Human and cattle DNA were quantified by spectrophotometry using NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and the quality was evaluated by amplifying the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) [11].

2.4. PCR and DNA sequencing

The presence of BLV *env*, *pol*, *tax* and *gag* genes in human mammary tissue and cattle blood was assessed by PCR using 50 ng of DNA from each sample. A 446 bp fragment of the *env* gene was amplified using OBLV1A F and OBLV6A R primer pair [22]; a 279 bp fragment of the *gag* gene was amplified using primers BL2 F and BLRT2 R (present study); for *tax* gene, a nested PCR was conducted using primers that generated a 113 bp fragment [11]; and for the *pol* gene, a nested PCR was carried out using primers that amplified a 157 bp fragment [11]. A partial GAPDH gene (857 bp) was amplified as described previously [11] and used as internal control of DNA quality. Primer sequences and further details are described in Table 1. Precautions were taken to avoid cross contamination between samples and positive control such as use of a DNA free area equipped with a laminar flow chamber with materials and gloves exclusive to the PCR mix and another flow chamber to work with DNA from the samples. Positive and negative samples were used as controls [10] and non-template (DNA-free) water samples were used throughout the assay to assure trustful results. Positive partial *env* [22] and *gag*-PCR products were purified using the PureLink™ Quick PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according manufacturer's recommendations. Both DNA strands were sequenced with an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer utilizing a BigDye Terminator v.3.1 cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.5. Phylogenetic analysis

The *env* sequences were *de novo* assembled using Geneious Prime 2019 1.3 (https://www.geneious.com). A total of 57 *env* partial nucleotide sequences representative of the 10 previously proposed BLV genotypes [23] were retrieved from GenBank database and aligned using CLUSTAL W (available in MEGA 7). The phylogenetic tree was constructed using maximum-likelihood (ML) inference, K2 + I substitution model in 1000 bootstraps using MEGA 7.

3. Results

3.1. Investigation of the frequency of BLV DNA in human and cattle

Fifty nine formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) women breast tissue were analyzed by PCR to detect BLV *env* [22], *gag*, *pol* and *tax* genes [11]. From these, 86.4% (51/59) of the samples were positive for at least one of the PCR protocols: the most frequently detected sequence was from the *env* gene that was found in 66.1% (39/59) of the samples followed by the *tax* and *gag* genes that were detected in 37.2% (22/59) and 11.9% (7/59), respectively. None of the samples was positive for the *pol* gene. In 18.6% (11/59) of the samples, both the *env* and *tax* genes were amplifies while 10.2% (6/59) were positive for both *gag* and *tax* genes; no positive samples were found for both *env* and *gag* genes (Fig. 1). Only 13.6% (8/59) samples were negative for all BLV genes tested. Amongst bovine samples all were positive for the *env* gene and had a high identity (*E*-value 0.0) to BLV nucleotide sequences deposited in GenBank. The bovine samples were solely tested for partial *env* gene, as it is the region used for BLV genotyping.

3.2. Sequence analysis

The partial *env* amplification products obtained from 39 women and 30 cattle samples were sequenced and analyzed. The nucleotide identity of the sequences obtained from women ranged from 98.8 to 100% amongst them and grouped into genotype 1 (G1), while the sequences obtained from cattle clustered into G1 (98.8–100% nt identity) and G7 (98.4–99.1% nt identity). The nucleotide identity between BLV DNA sequences obtained from women and cattle from G1 ranged from 97.8 to 99.7%.

The ML tree showed a well-supported topology with 10 independent clusters that represent the 10 different BLV genotypes (Fig. 2). From the 39 partial *env* sequences obtained from women breast tissue, only four (Human 9, 14, 25 and 36) were different from each other and, for further

Table 1
BLV and internal control primers and cycling conditions for PCR in human and bovine samples.

BLV gene	→Primer sequences 5′ 3′	Nested PCR	Product lenght	Annealing temperature	Ref.
env	F: CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATACA		446 bp	60° C	[22]
	R: CCAACATATAGCACAGTCTGGGAAGGC				
gag	F: TGCTTGGGCACTCCGAT (position 991–1010)		279 bp	60° C	Present study
	R: TTGGGCTGAGCTGATTGTTG (position 1269–1250)				
	F: TAGCCTACGTACATCTAACC	outer	232 bp	52° C	[11]
pol	R: AATCCAATTGTCTAGAGAGG				
	F: GGTCCACCCTGGTACTCTTC	inner	157 bp	57° C	
	R: TATGGGCTTGGCATACGAGC				
	F: CTTCGGGATCCATTACCTGA	outer	373 bp	55° C	
tax	R: GCTCGAAGGGGGAAAGTGAA				
	F: ATGTCACCATCGATGCCTGG	inner	113 bp	55° C	
	R: CATCGGCGGTCCAGTTGATA				
Human GAPDH	F: CCTTCATTGACCTTCACTACATGGTCTA		857 bp	59° C	
	R: GCTGTAGCCAAATTCATTGTCGTACCA				

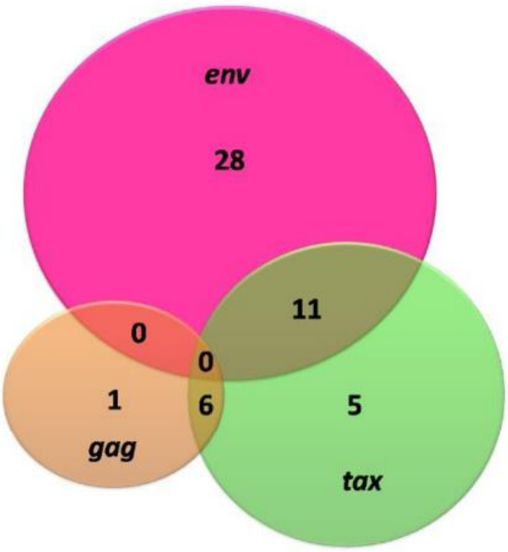

Fig. 1. Frequency of detection of different BLV provirus genes in women breast tissue.

analysis, they were then selected to represent all sequences obtained. Amongst the 30 sequences obtained from cattle, 27 clustered into G1 and from these, the three most diverse (Bov 25, 271 and 2575) were selected to be represented in our sequence analysis. The remaining three samples (Bov29, 32 and 49) clustered into G7.

Non-synonymous mutations were observed in the partial *env* sequences detected in women and cattle (Fig. 3). In addition, silent mutations in BLV DNA sequences obtained from women and cattle were also observed (Supplementary Material 1). Further analysis of amino acid substitutions indicated that they were distributed in different domains of the BLV gp51. Bovine leukemia viral DNA sequenced from human breast tissue had amino acid substitution at the CD4+ (V106L) and E epitope (D190A) when compared with the Brazilian AF399703.3 sequence as reference. Cattle BLV G1-grouped isolates had substitution in the *E*-epitope region (S189R) and G7-grouped isolates had substitution in the neutralizing domain 2 (N134D) and E-epitope (V192F) regions.

4. Discussion

Here, we demonstrate that the nucleotide sequence of BLV *env* gene found on DNA extracted from human breast tissue is genetically similar to that found on cattle blood samples collected at the same time period and geographical region. By nucleotide sequencing we found that all BLV DNA present in human breast tissue grouped into G1 which is the most prevalent genotype within cattle samples.

In addition to bovines, BLV infects capybaras sheep, alpacas and buffalo [3]. Although BLV is a lymphotropic virus, *in situ* techniques demonstrated that in cattle BLV is more abundantly found in mammary epithelium tissue than in lymphocytes [7] and, as such, is transmitted to suckling calves *via* colostrum and milk [24]. The historical intimate contact between humans and cattle and the consumption of cattle-derived products may have given the virus a chance for adapting to a new host. It could be possible that the virus originated in another species or passed through another host before reaching humans but the evidences available so far suggest that the route of transmission was cattle-to-humans.

Out of the 59 human breast tissue samples analyzed, 51 (86.4%) were positive for at least one of the BLV genes. The *env* gene was most consistently found followed by *gag* and *tax*; no sample was positive for *pol* (Fig. 1). Although previous studies reported the presence of BLV DNA in human breast tissue, in at least three different studies BLV DNA was not detected in breast tissue, blood cell lines and human cancer cell lines [25–27] . These conflicting results might be related to the methodology used to detect BLV DNA sequences. DNA amplification by PCR was used in most studies *versus* whole genome sequencing in a single study. Also, it might be possible that the viral DNA sequence targeted by the PCR was not present on the genomes analyzed. Indeed, partial genome deletions following integration into the host cells are common and considered an important mechanism to avoid the host immune response [28]. In a study conducted with the BLV-related PTLV-1, deletions of the host genome-integrated provirus initiated in the *gag* region, followed by deletions of the *pol* and *env* genes; in contrast, the *tax* and *LTR* regions were the less frequently deleted genes [29]. The lack of *tax* expression due to a mechanism of silencing is a strategy to avoid immune detection, however, it results in tumor development [28,30]; this, *per se*, could be a mechanism of BLV-induced tumorigenesis in humans. Depending on the time of integration into the host genome, structural genes are the first to be deleted since their products are targets of the immune system [31]. The high frequency of *env* gene detection in human samples suggests that the species spillover might have been recent and the different rates of detection is and indication that the provirus could be defective in specific genes. In addition, polymorphisms in the primer binding sequence or efficiency of the PCR protocols for detecting different genes could contribute to unequal detection rates. Also, the populations studied were from different regions and with different rates of consumption of cattle-derived products [32] and these could impact on the result reported. And, finally, DNA damaged by the process of preparing samples for FFPE could also contribute to reduce the rate of detection; in our study, to rule out this, we run an internal GAPDH PCR amplification control and all samples resulted positive.

Our comparison of BLV nucleotide sequences showed 13 silent nucleotide substitutions and eight non-synonymous substitutions

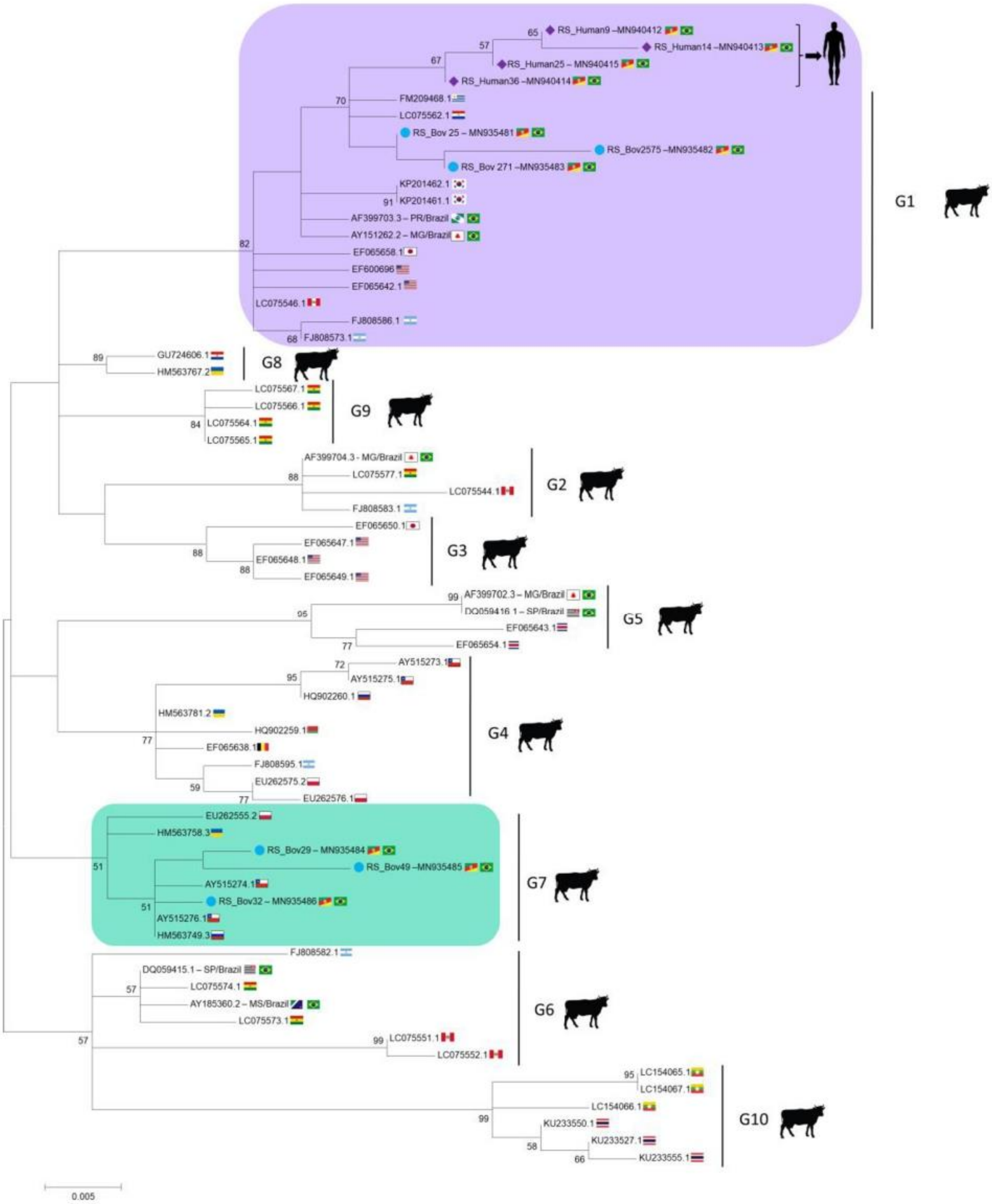

Fig. 2. Phylogenetic analysis of the partial *env* gene nucleotide sequences (446 bp) from BLV DNA obtained in Brazil ( ) and other countries (respective flags). Phylogenetic tree was generated using the Maximum Likelihood method. The ten known major genotypes are labeled G1 to G10. Our human and cattle sequences are indicated with a purple rhombus and blue circles, respectively. The flags represent the countries where the samples were analyzed and reported: Uruguai ( ), Paraguai ( ), South Korea ( ), Japan ( ), United States of America ( ), Peru ( ), Argentina ( ), Croatia ( ), Ukraine ( ), Bolivia ( ), Costa Rica ( ), Chile ( ), Russia ( ), Belarus ( ), Belgium ( ), Poland ( ) and Myanmar ( ).The other flags correspond to Brazilian states: Rio Grande do Sul ( ), Paraná ( ), Minas Gerais ( ), São Paulo ( ) and Mato Grosso do Sul ( ). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

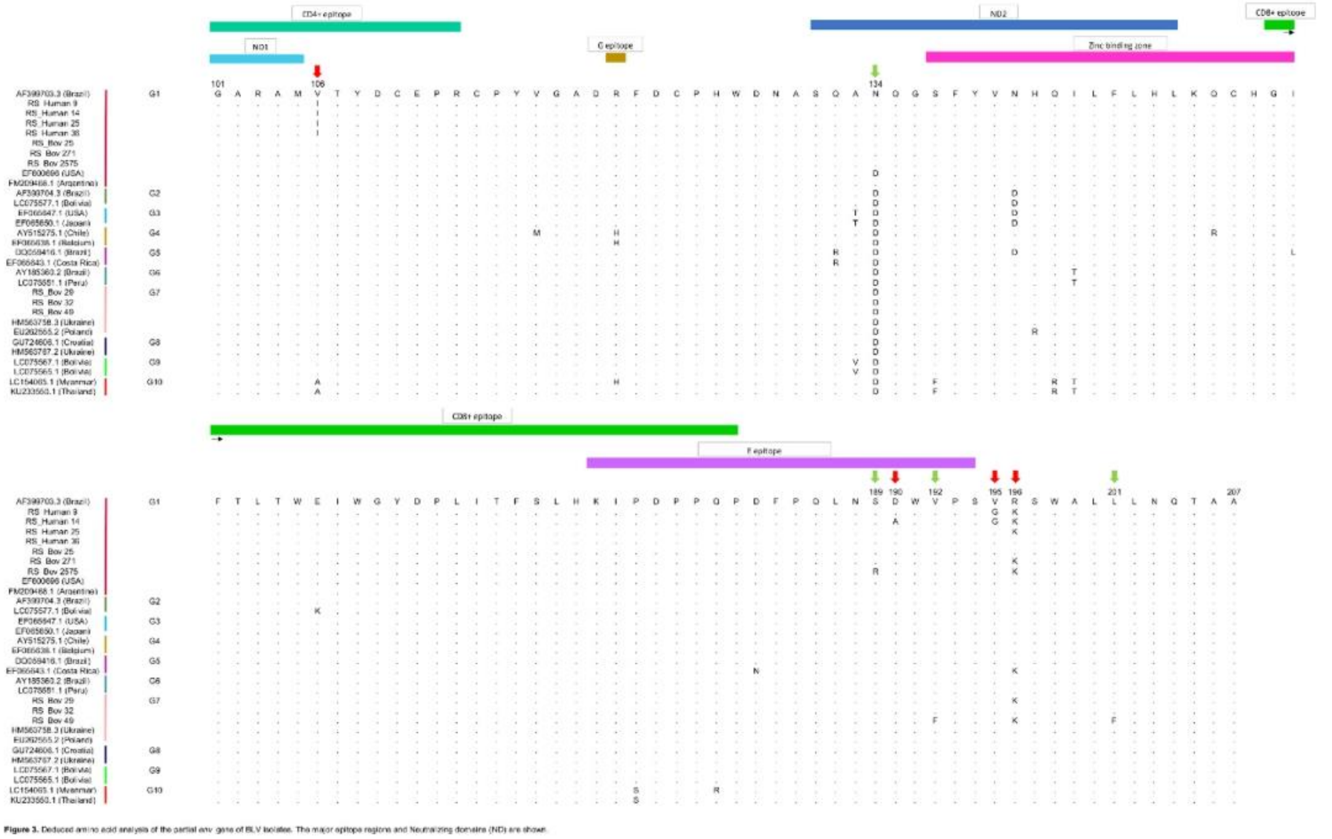

Fig. 3. Deduced amino acid analysis of the partial *env* gene of BLV isolates. The major epitope regions and neutralizing domains (ND) are shown.

(Supplementary Material 1). All human sequences and two bovine sequences from G 10 presented amino acid substitutions in a CD4+ epitope and only sequences represented by Human14 presented substitution in *E*-epitope. The CD4+ epitope is a T-lymphocyte recognition site and mutations on this site suggest that the virus is under pressure from the host immune system [33]. All bovine sequences that grouped into G7 showed amino acid substitutions in the ND2 domain, which is involved in virus neutralization and syncytium inhibition [33]; but, in contrast, only one sequence that grouped into G1 (Bov2575) and one that grouped in G7 (Bov49) had amino acid substitutions in the *E*-epitope which is also involved in virus neutralization [33]. In addition, in our sequences, conserved regions were observed in the ND1, G-epitope, zinc-binding zone and CD8+ epitope. The mutations that occur in viral proteins might allow viruses to infect a wider range of hosts by facilitating interaction with host cell receptors. The cellular receptor for BLV is not yet clearly defined but adaptor protein complex (AP-3) is believed to play an important role in BLV entry into cattle cells [34]. Human cells have five types of AP and these may be receptors analogous to those used by the virus in cattle [35,36]. The AP complexes are involved in the transport of intracellular vesicles and are located in the cytoplasmic membrane and in the Golgi complex [36]. In addition, the mutations observed in the *env* gene might be responsible for changing the viral tropism and may cause the virus to acquire the ability to infect a new host [37].

Emerging diseases are defined by those new infections resulting from the evolution or change of an existing pathogen, resulting in a broader host range, pathogenicity changes and the occurrence of unrecognized diseases [38]. Once a virus has established itself in the human population, the dynamics of virus transmission between people can lead to a public health problem. Like most retrovirus infections, transmission only occurs when an infected cell is transmitted to an uninfected host [39]. Thus, the fact that BLV DNA has already been detected in the blood of humans reinforces this hypothesis [16,17]. Additionally, several lines of evidence accumulated over the past few years indicate that BLV DNA is associated with breast cancer in women from Colombia [10], USA [12,40], Australia [13], Iran [16], Argentina [14] and Brazil [15]. Breast cancer is a multifactorial disease and is the most common cancer amongst women worldwide. In Brazil over 66,000 new cases of breast cancer are estimated for the year 2020 which represents an incidence rate of 43.74 cases per 100,000 women [20]. It is estimated that 16% of the cancers can be attributed to viruses, with higher percentages for developing countries [41].

The way BLV could be transmitted to humans still needs to be elucidated. The finding of BLV gene segments in raw beef and fresh cattle milk destined for human consumption suggests that it could be a foodborne infection [42]. Furthermore, a recent study revealed the presence of BLV RNA in the air and on surfaces at dairy workplaces, which may be a source of occupational infection [43]. It is believed that the virus may have long been integrated into the genome of humans when animal products were not controlled and pasteurization was not obligated in many parts of the world [10]. In this way, after infection, person-to-person transmission could also occur, just as with PTLV [29].

Although we clearly demonstrated the presence of BLV DNA in humans and its genetic relatedness to cattle BVL, we acknowledge that our study might have some limitations. First, *in-situ* hybridization (ISH) and subsequent histologic images would allow us to precisely identify which cell type is harboring BLV DNA and enhance these data considerably; second, we used cattle blood samples rather than mammary tissue; third, sample size was limited because we wanted to test four genes and so we had to limit the number of samples because of budget limitation; and fourth, PCR detection may have had some bias such as sensitivity of the primers and the protocol used. Still, age, genetic factors, eating habits and other factors are potential biases of the study but in no way these would lessen the importance of our findings.

In conclusion, our study indicates that BLV DNA sequences obtained at the same time period and geographical region from cattle and women breast tissue are genetically related. Our data strengthen previous hypothesis that BLV might be a zoonotic agent. Further studies designed to elucidate the transmission between human and cattle, and the biology of BLV infection in human are still required to fully estimate the BLV zoonotic potential.

Author statement

RC conceived the idea of the manuscript, conceptualization, formal analysis, writing and review of the manuscript. MW and RB contributed with methodology, writing and investigation. MS and DS contributed with methodology. CC and LK contributed with conceptualization, funding acquisition, methodology, writing and review of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgment

Experiments and authors were supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Finance Code 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Propesq/UFRGS). L.C. Kreutz holds a research fellowship from CNPq (307900/2016-9).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100252.

References

[1] N. Sagata, T. Yasunagat, J. Tsuzuku-Kawamura, K. Ohishi, Y. Ogawat, Y. Ikawa, Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses Proc, Nati. Acad. Sci. USA. 82 (1985) 677–681.

[2] M.L. Mirsky, C.A. Olmstead, Y. Da, H.A. Lewin, The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection, J. Virol. 70 (1996) 2178–2183.

[3] A. Burny, Y. Cleuter, R. Kettmann, M. Mammerickx, G. Marbaix, D. Portetelle, A. Van Den Broeke, L. Willems, R. Thomas, Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer, Vet. Microbiol. 17 (1988) 197–218.

[4] L. Willems, H. Heremans, G. Chen, D. Portetelle, A. Billiau, A. Burny, R. Kettmann, Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and ha-ras oncogene product in cellular transformation, EMBO J. 9 (1990) 1577–1581, https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08277.x.

[5] L. Benit, P. Dessen, T. Heidmann, Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes, J. Virol. 75 (2001) 11709–11719, https://doi.org/10.1128/jvi.75.23.11709-11719.2001.

[6] M. Polat, S. Nosuke Takeshima, K. Hosomichi, J. Kim, T. Miyasaka, K. Yamada, M. Arainga, T. Murakami, Y. Matsumoto, V. Barra Diaz, C.J. Panei, E.T. González, M. Kanemaki, M. Onuma, G. Giovambattista, Y. Aida, A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis, Retrovirology 13 (2016) 1–23, https://doi.org/10.1186/s12977-016-0239-z.

[7] G.C. Buehring, P. Kramme, R. Schultz, Evidence for bovine lukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows, Lab. Investig. 71 (1994) 394.

[8] M.J. Burridge, The zoonotic potential of bovine leukemia virus, Vet. Res. Commun. 5 (1981) 117–126, https://doi.org/10.1007/BF02214976.

[9] G.C. Buehring, S.M. Philpott, K.Y. Choi, Humans have antibodies reactive with bovine leukemia virus, AIDS Res. Hum. Retrovir. 19 (2003) 1105–1113, https://doi.org/10.1089/088922203771881202.

[10] M. Giovanna, U.J. Carlos, U.A. María, M.F. Gutierrez, Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue, Open J. Med. Microbiol. 03 (2013) 84–90, https://doi.org/10.4236/ojmm.2013.31013.

[11] G.C. Buehring, K. Choi, H. Jensen, Bovine leukemia virus in human breast tissues, Breast Cancer Res. 3 (2014), https://doi.org/10.1186/bcr338.

[12] G.C. Buehring, H.M. Shen, H.M. Jensen, D.L. Jin, M. Hudes, G. Block, Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: a case-control study, PLoS One 10 (2015) 1–13, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134304.

[13] G.C. Buehring, H. Shen, D.A. Schwartz, J.S. Lawson, Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development, PLoS One 1 (2017) 61–63, 10.1385/Forensic Sci. Med. Pathol.:1:1:61.

[14] M.C. Ceriani, P.A. Lendez, L.M. Cuesta, M.V.A.N. Farias, G.C. Buehring, G. L. Dolcini, Bovine leukemia virus presence in breast tissue of Argentinian women. Its association with cell proliferation and prognosis markers, Multidiscip. Cancer Investig. 2 (2018) 16–24, https://doi.org/10.30699/acadpub.mci.4.16.

[15] D. Schwingel, A.P. Andreolla, L.M.S. Erpen, R. Frandoloso, L.C. Kreutz, Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil, Sci. Rep. (2019) 1–7, https://doi.org/10.1038/s41598-019-39834-7.

[16] M. Khalilian, S.M. Hosseini, O. Madadgar, Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women, Microb. Pathog. 135 (2019) 103566, https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103566.

[17] G.C. Buehring, A. Delaney, H. Shen, D.L. Chu, N. Razavian, D.A. Schwartz, Z. R. Demkovich, M.N. Bates, Bovine leukemia virus discovered in human blood, BMC Infect. Dis. 19 (2019) 1–10, https://doi.org/10.1186/s12879-019-3891-9.

[18] O.M. Gannon, A. Antonsson, I.C. Bennett, N.A. Saunders, Viral infections and breast cancer – a current perspective, Cancer Lett. 420 (2018) 182–189, https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.01.076.

[19] WHO, Breast Cancer: Prevention and Control. https://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html#:~:text=Althoughbreast cancer is thought,100%2C000 women in Western Europe, 2012.

[20] WHO, Breast Cancer. https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/, 2019 (accessed January 9, 2020).

[21] J. Sambrook, D.W. Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor, USA, 2001.

[22] S.M. Rodakiewicz, M.L. Fernandez, M.L. Munhoz, F.H. Scheffer, M. Urio, F. Forell, S. Ferraz, V.M. Portes, U.M. Costa, Heterogeneity determination of bovine leukemia virus genome in Santa Catarina, 2018, pp. 1–7, https://doi.org/10.1590/1808.

[23] Y. Yang, S. Chu, S. Shang, Z. Yang, C. Wang, Short communication: genotyping and single nucleotide polymorphism analysis of bovine leukemia virus in Chinese dairy cattle, J. Dairy Sci. (2019) 1–5, https://doi.org/10.3168/jds.2018-15481.

[24] S. Watanuki, S.N. Takeshima, L. Borjigin, H. Sato, L. Bai, H. Murakami, R. Sato, H. Ishizaki, Y. Matsumoto, Y. Aida, Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams, Vet. Res. 50 (2019) 1–12, https://doi.org/10.1186/s13567-019-0724-1.

[25] N.A. Gillet, L. Willems, Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA, Retrovirology. (2016) 1–7, https://doi.org/10.1186/s12977-016-0308-3.

[26] S. Saito, Y. Kitamura, M. Fumiko, K. Meripet, S. Takeshima, Absence of bovine leukemia virus proviral DNA in Japanese human blood cell lines and human cancer cell lines, Arch. Virol. (2019), https://doi.org/10.1007/s00705-019-04474-9.

[27] R. Zhang, J. Jiang, W. Sun, J. Zhang, K. Huang, X. Gu, Y. Yang, X. Xu, Y. Shi, C. Wang, Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients, Breast Cancer Res. 18 (2016) 8–9, https://doi.org/10.1186/s13058-016-0763-8.

[28] N. Rosewick, K. Durkin, M. Artesi, A. Marçais, V. Hahaut, P. Griebel, N. Arsic, V. Avettand-Fenoel, A. Burny, C. Charlier, O. Hermine, M. Georges, A. Van Den Broeke, Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis, Nat. Commun. 8 (2017), https://doi.org/10.1038/ncomms15264.

[29] S. Kamihira, K. Sugahara, K. Tsuruda, S. Minami, A. Uemura, N. Akamatsu, H. Nagai, K. Murata, H. Hasegawa, Y. Hirakata, Y. Takasaki, K. Tsukasaki, Y. Yamada, Proviral status of HTLV-1 integrated into the host genomic DNA of adult T-cell leukemia cells, Clin. Lab. Haematol. 27 (2005) 235–241, https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.2005.00698.x.

[30] M. Merimi, P. Klener, M. Szynal, Y. Cleuter, C. Bagnis, P. Kerkhofs, A. Burny, P. Martiat, A. Van Den Broeke, Complete suppression of viral gene expression is associated with the onset and progression of lymphoid malignancy : observations in Bovine Leukemia Virus-infected sheep 9 (2007) 1–9, https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-51.

[31] X. Zhuo, C. Feschotte, Cross-species transmission and differential fate of an endogenous retrovirus in three mammal lineages, PLoS Pathog. 11 (2015), https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005279.

[32] G.C. Buehring, Response to Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients, Breast Cancer Res. 19 (2017) 19–20, https://doi.org/10.1186/s13058-017-0808-7.

[33] A. Pluta, L.M. Albritton, M. Rola-Łuszczak, J. Kuźmak, Computational analysis of envelope glycoproteins from diverse geographical isolates of bovine leukemia virus identifies highly conserved peptide motifs, Retrovirology. 15 (2018) 1–13, https://doi.org/10.1186/s12977-017-0383-0.

[34] T. Suzuki, Y. Matsubara, H. Kitani, H. Ikeda, Evaluation of the δ subunit of bovine adaptor protein complex 3 as a receptor for bovine leukaemia virus, J. Gen. Virol. 84 (2003) 1309–1316, https://doi.org/10.1099/vir.0.18763-0.

[35] M.S. Robinson, J.S. Bonifacino, Adaptor-related proteins, Curr. Opin. Cell Biol. (2001) 444–453.

[36] S.Y. Park, X. Guo, Adaptor protein complexes and intracellular transport, Biosci. Rep. (2014) 381–390, https://doi.org/10.1042/BSR20140069.

[37] J.E. Henzy, R.J. Gifford, W.E. Johnson, J.M. Coffin, A novel recombinant retrovirus in the genomes of modern birds combines features of avian and mammalian retroviruses, J. Virol. 88 (2014) 2398–2405, https://doi.org/10.1128/jvi.02863-13.
[38] M.S. Leonel, Enzootic Bovine Leukosis, OIE Terr. Man. 3 (2018) 56, https://doi.org/10.3929/ethz-b-000238666.
[39] I. Schwartz, D.L. Lévy, Pathobiology of bovine leukemia virus, Vet. Res. 25 (1994) 521–536.
[40] K.A. Baltzell, H.M. Shen, S. Krishnamurthy, J.D. Sison, G.J. Nuovo, G.C. Buehring, Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: case-control study of women in Texas, Cancer. 124 (2018) 1342–1349, https://doi.org/10.1002/cncr.31169.
[41] J.K. Oh, E. Weiderpass, Infection and cancer: global distribution and burden of diseases, Ann. Glob. Heal. 80 (2014) 384–392, https://doi.org/10.1016/j.aogh.2014.09.013.
[42] M.A. Patarroyo, M.F. Gutierrez, Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption, Epidemiol. Infect. 145 (2017) 3125–3130, https://doi.org/10.1017/S0950268817002229.
[43] A. Stobnicka-Kupiec, M. Gołofit-Szymczak, R.L. Górny, M. Cyprowski, Prevalence of bovine leukemia virus (BLV) and bovine adenovirus (BAdV) genomes among air and surface samples in dairy production, J. Occup. Environ. Hyg. 17 (2020) 312–323, https://doi.org/10.1080/15459624.2020.1742914.

2.2 Capitulo 2: Determinação do caráter zoonótico do vírus da leucose bovina

Projeto Bilateral UFRGS-HMV

Os experimentos apresentados a seguir iniciou em agosto/2020 e as análises estão em andamento. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Moinhos de Vento (HMV) sob protocolo de número 4.173.386.

PESQUISADORES ASSOCIADOS

Sirlei dos Santos Costa – Médica credenciada do Corpo Clínico do Hospital Moinhos de Vento; MSc. Dr; Especialista em Cirurgia Plástica pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Plastica e Associação Medica Brasileira; Especialista em Mastologia pela Sociedade Brasileira de Mastologia e Associação Medica Brasileira.

Rosa Maria Blotta - Médica credenciada do Corpo Clínico do Hospital Moinhos de Vento, Mestre em Medicina – cirurgia pela UFRGS; Especialista em Cirurgia Plástica pela Sociedade Brasileira de Cirurgia Plastica e Associação Medica Brasileira

2.2.1 OBJETIVOS

2.2.1.1 Objetivos gerais

Detectar, isolar e caracterizar o vírus da leucose bovina em tecido mamário fresco e sangue de humanos.

2.2.1.2 Objetivos específicos

- Isolar o vírus a partir de amostras teciduais humanas e do sangue;
- Verificar se mulheres com câncer de mama apresentam com maior frequência a presença do vírus;
- Avaliar a relação entre a presença do vírus e a idade das pacientes;
- Avaliar a relação entre a presença do vírus, presença de tumor e origem étnica dessas mulheres (ancestrais étnicos);

• Avaliar a frequência do consumo de alimentos de origem bovina em relação à presença do vírus e ocorrência do tumor.

2.2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.2.1 Seleção de amostras

2.2.2.1.1 Cálculo de amostra

Para o cálculo de amostra levou-se em consideração a proporção de DNA de BLV encontrado em tecido mamário (30,5% em casos e 13,9% em controles) em um estudo brasileiro (SCHWINGEL et al., 2019). Considerando um poder amostral de 80% e nível de significância de 5%, a amostra total necessária é de 198 participantes (99 casos e 99 controles). Estimando 10% de perdas, a amostra a ser recrutada é de 218 pacientes.

2.2.2.1.2 Participantes

A população-alvo do estudo são mulheres que são submetidas a cirurgia mamária no Hospital Moinhos de Vento, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

2.2.2.1.3 Seleção de casos

São selecionadas pacientes com diagnóstico de câncer de mama com idades entre 18 a 90 anos que são submetidas à tratamento cirúrgico. São incluídas no estudo as pacientes independentemente do grau e do tipo das lesões malígnas no tecido mamário. Os critérios de exclusão são a negativa da paciente e o uso de anti-retrovirais.

2.2.2.1.4 Seleção de controles

São selecionadas pacientes que são submetidas à cirurgia mamária eletiva benigna. São incluídas mulheres com idades entre 18 a 90 anos, portadoras de lesões benignas, tais como fibroadenomas, cirurgias de redução do volume mamário, colocação de próteses de silicone para aumento mamário e correções de deformidades das mamas. Os critérios de exclusão são a negativa da paciente e o uso de anti-retrovirais. É selecionado um controle para cada caso de tratamento.

2.2.3 Procedimento do estudo e processo de obtenção de dados e variáveis

2.2.3.1 Coleta de dados

A coleta de informações sobre o histórico das pacientes é realizado por meio de prontuários e do questionário que é aplicado no momento da consulta. O avaliador do desfecho está cegado para a identificação das amostras. Estas são nomeadas por data, número da ordem de coleta e iniciais da paciente.

2.2.3.1.1 Coleta de amostras humanas

2.2.3.1.1.1 Tecido mamário fresco

Um total de 218 amostras de tecido mamário de mulheres submetidas à cirurgia de mama eletiva benigna (grupo controle, com tipo celular normal, sem presença de malignidade ou pré-malignidade) e de mulheres submetidas a tratamento cirúrgico de câncer de mama. Para este estudo, são coletadas aleatoriamente 5 porções de 100 mg de tecido mamário fresco contendo segmento do ducto lobular, no qual se encontra o tecido epitelial, e armazenados em tubos de microcentrífuga esterilizados, refrigerados e posteriormente armazenado a -80 °C até análise. Uma porção de tecido será encaminhada para análise histopatológica no setor de patologia do HMV, conforme protocolo interno previamente estabelecido para todas as amostras de tecido removidas cirurgicamente.

2.2.3.1.1.2 Sangue

Dois tubos de 5 mL de sangue com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) são coletados na rotina pré-anestésica, durante o procedimento cirúrgico no HMV, e são enviados sob refrigeração para o Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Posteriormente, o sangue é centrifugado a 500 x g por 10 min e a camada de leucócitos e plasma são armazenadas em tubos de microcentrífuga esterilizados e estes armazenados a -20°C.

2.2.3.2 Extração de DNA

Para as amostras de tecido, é realizada a maceração dos 5 fragmentos do tecido, removendo o tecido adiposo e então são solubilizadas em 3 mL de PBS (pH 7,2). Para as amostras de sangue, é feita a extração de DNA a partir 100 µL de leucócitos. Para os dois tipos de amostras, a extração de DNA é feita utilizando o protocolo fenol-clorofórmio (SAMBROOK; MACCALLUM, 2001).

2.2.3.3 Extração de RNA

O RNA total é extraído a partir de 250 µL de amostra utilizando TRIzol LS (Life Technologies, Carlsbad, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O RNA extraído é eluído em 50 µL de água ultrapura e tratado com a enzima RQ1 DNAse (Promega, Madison, WI, USA) para eliminar a contaminação de DNA . O cDNA é sintetizado a partir de 2 µL do RNA extraído, utilizando o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, EUA) com 2 pmol/µL de cada um dos primers reversos da reação de PCR, em volume total de 20 µL, seguindo recomendações do fabricante.

2.2.3.3.1 Avaliação da qualidade e concentração de DNA e RNA

A qualidade e quantidade do DNA e RNA extraído é avaliada com NanoDrop (Thermo Scientific, USA). O controle da qualidade das extrações de DNA e da reação em cadeia da polimerase (PCR) é feito utilizando o gene housekeeping Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase humano (GAPDH).

2.2.3.4 PCR e RT-PCR

A presença dos genes *env, gag, LTR, pol,* e *tax* no tecido mamário e no sangue é avaliada por meio de PCR e RT-PCR utilizando oligonucleotídeos e temperatura de anelamento (TM) específicos para cada par de primers. Oligonucleotídeos e TM estão descritos na Tabela 1.

2.2.3.5 Sequenciamento de DNA

As amostras de DNA positivas na PCR são purificadas utilizando o kit PureLink™ Quick PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendções do fabricante. As duas fitas de DNA (forward e reverse) são sequenciadas com ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer utilizando BigDye Terminator v.3.1 cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para confirmação da presença de cada gene de BLV.

2.2.3.6 Isolamento viral

O isolamento viral será realizado de acordo com protocolo descrito pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) (LEONEL, 2018) das amostras positivas na PCR. Brevemente, 0,5 mL de tecido mamário solubilizado será co-cultivado com células FLK por um período de 3 a 4 dias em meio de cultura DMEM (Dulbecco Minimal Essential Media) contendo 20% de soro equino (SE). O efeito citopático do vírus é caracterizado pela formação de sincícios. A presença do vírus no cultivo será confirmada por PCR para o gene *tax*. O mesmo será feito para isolamento viral a partir da camada de leucócitos, em que será utilizado um volume de 0,5-1,5 mL.

2.2.4 Questões éticas

O estudo foi projetado de acordo com as diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução 466/12), as quais os pesquisadores declaram conhecer e seguir. Os dados coletados somente são utilizados para o projeto ao qual se vinculam. As identidades das pacientes envolvidas no estudo são mantidas em sigilo.

Está assegurada a garantia do sigilo das informações e os dados utilizados para publicação não permitem que a paciente seja identificada. Os dados são utilizados apenas pela equipe do estudo e autoridades regulatórias da área da saúde. A paciente não tem nenhuma despesa e não há compensação financeira relacionada à sua participação na pesquisa.

Para a coleta dos dados, são avaliados os prontuários das pacientes. Desse modo, faz-se necessário o Termo de Compromisso de Utilização de Prontuários e Base de Dados, bem como o Termo de Responsabilidade.

O TCLE é aplicado no momento do convite à participação no estudo e somente são incluídas no estudo aquelas que aceitam participar e assinam o TCLE. O TCLE é aplicado durante a entrevista com as pacientes, juntamente com a realização do questionário (Suplementar 1 e 2, respectivamente).

2.2.5 Resultados preliminares

Até a presente data, foram analisadas 25 amostras de tecido mamário e 25 amostras de sangue por meio de PCR para os 5 genes de BLV previamente mencionados. O esquema do experimento será apresentado em forma gráfica (Figura 3). Brevemente, as amostras são coletadas no HMV (Figura 3.1) e levadas sob refrigeração para o laboratório (Figuras 3.2a e 3.2b), normalmente no mesmo dia. O tecido mamário é macerado (Figuras 3.3a e 3.4a), a extração do material genético é realizada (Figura 3.5a) e na sequência é realizada PCR (Figra 3.6) para os 5 genes de BLV e GAPDH humano. A amostra de sangue (Figura 3.2b) é submetida a centrifugação (Figura 3.3b) e a camada de leucócitos é coletada (Figura 3.4b), o material genético é extraído (Figura 3.5b) e por fim a PCR (Figura 3.6) também para os 5 genes e GAPDH humano é realizada. São utilizados controle de qualidade da extração (GAPDH humano) e uma amostra tecidual humana foi contaminda com uma amostra sabidamente positiva para BLV, para eliminar a possibilidade da interferência de inibidores da reação nos resultados. Além disso, uma amostra bovina sabidamente positiva é utilizada desde a extração até a PCR como controle positivo. Todas as amostras foram negativas para os 5 genes, tanto no tecido mamário quanto em leucócitos.

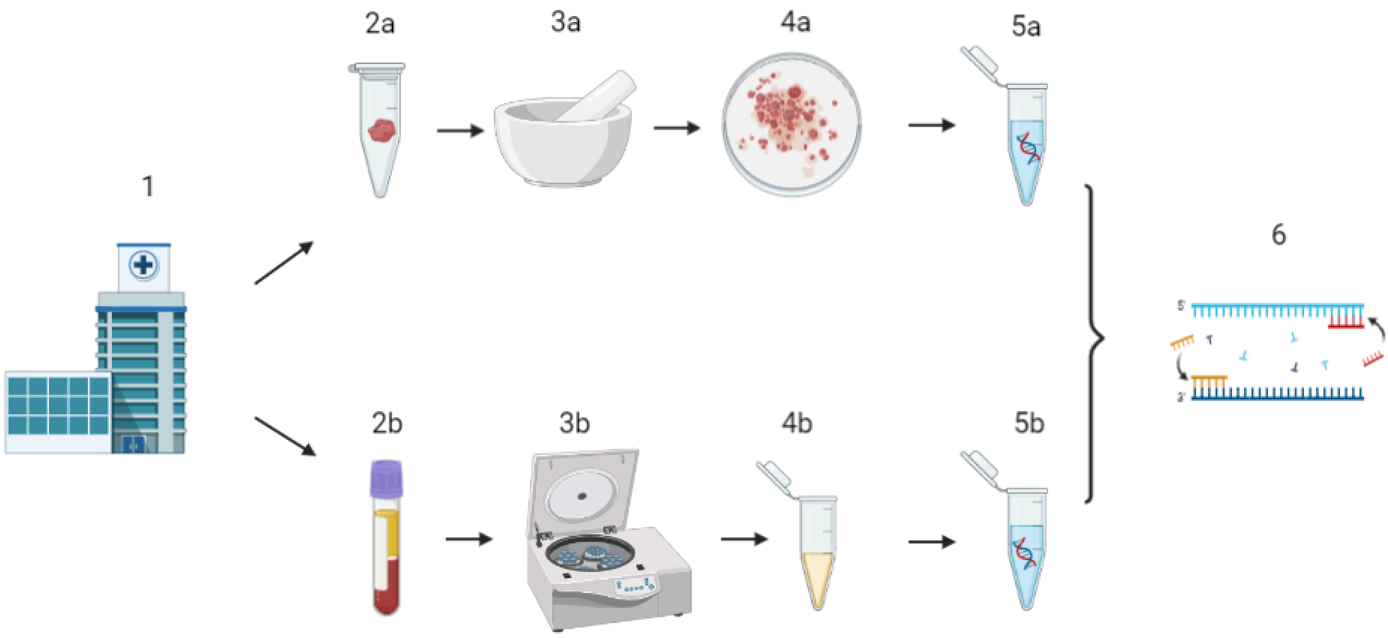

Figura 3. Representação esquemática dos materiais e métodos. (1) coleta da amostra; (2a e 2b) transporte do tecido e sangue para o laboratório de virologia; (3a e 4a) maceração do tecido; (5a) extração de material genético; (6) PCR; (3b) centrifugação do sangue; (4b) coleta da camada de leucócitos; (5b) extração de material genético e (6) PCR.

3 PERSPECTIVAS

O presente projeto pretende colocar em evidência o papel do BLV no desenvolvimento do câncer de mama e tentar demonstrar a sua capacidade de infecção em seres humanos e envolvimento na etiologia do câncer de mama. Desta forma, é importante enfatizar que o número de amostras coletados até a presente data é inferior ao ideal calculado estatisticamente, podendo justificar a ausência do BLV nas amostras analisadas até a presente data. As amostras serão coletadas até atingir o número ideal calculado.

4 CONCLUSÃO

O Capítulo 1 trouxe atenção para o envolvimento do BLV como um agente zoonótico, demonstrando a presença do material genético do BLV em amostras teciduais humanas com e sem câncer. A detecção dos genes através da PCR se mostrou uma ferramenta eficaz para a detecção do provírus. A alta similaridade do BLV encontrado em humanos e bovinos reforça a provável origem do vírus encontrado em humanos. No Capítulo 2, está sendo realizado um experimento inédito ao se utilizar amostras de tecido mamário fresco e é o primeiro trabalho pesquisando o BLV no sangue no Brasil. O número de amostras analisadas até a data pode ser o motivo pelo qual nenhuma amostra foi positiva. Outro fator, é que nos estudos anteriores foram analizadas amostras de tecido fixo parafinado, no qual é possível ter certeza que é o epitélio secretor, o que difere das amostras de tecido fresco, onde temos só uma avaliação macroscópica. A forma de transmissão, bem como o seu mecanismo oncogênico em seres humanos ainda não são bem estabelecidos. Acredita-se que a principal forma de contaminação seja através da ingestão e preparo de produtos de origem bovina crus ou sem tratamento térmico.

Suplementar 1

HOSPITAL MOINHOS DE VENTO
Instituto de Educação e Pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Detecção, isolamento e caracterização do Vírus viável da Leucose Bovina (BLV) em tecido mamário e leucócitos humanos

Você está sendo convidada a participar da pesquisa **"Detecção, isolamento e caracterização do Vírus da Leucose Bovina (BLV) em tecido mamário e leucócitos humanos"** que tem como objetivo principal detectar o vírus da leucose bovina em tecidos mamários e em leucócitos através de uma análise de técnica molecular.

Essa pesquisa será realizada em pacientes que foram diagnosticadas com lesões de mama compatíveis com malignidade e em mamas saudáveis (pacientes que se submeterão a cirurgia de mama eletiva benigna). Sua participação no estudo consistirá em responder algumas perguntas tais como: idade, origem étnica, tipo de alimentação, contato com animais bovinos, histórico familiar de câncer, entre outras. Essa entrevista terá duração de aproximadamente 10 minutos. Você será solicitada a autorizar a retirada de um fragmento de tecido mamário, durante o procedimento cirúrgico. Esse fragmento de tecido será destinado a pesquisa da presença do vírus. Durante o procedimento pré-anestésico será realizada a coleta de 10 ml de sangue, para também fazer a detecção e o isolamento do vírus (em caso de positividade).

Essa pesquisa não acrescenta nenhum risco adicional, além dos riscos inerentes ao procedimento cirúrgico que você irá se submeter. A participação no estudo oferece riscos mínimos relacionados ao desconforto em coletar tubos de sangue adicionais e à quebra de sigilo das informações.

As pacientes que aceitarem participar do estudo, ajudarão no melhor entendimento das causas do câncer de mama, além de saber o papel que o BLV possui no desenvolvimento da doença. Ainda, as informações obtidas nesse estudo trarão novas informações para a prevenção e tratamento do câncer de mama. As pacientes têm a liberdade de não responder ou de interromper a entrevista/participação no estudo em qualquer momento, sem nenhum prejuízo para o atendimento. A paciente tem a liberdade de não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, mesmo após o início da entrevista/ coleta de dados, ou no momento do procedimento cirúrgico sem qualquer prejuízo. Os dados serão utilizados apenas pela equipe do estudo e autoridades regulatórias da área da saúde. Você não terá nenhuma despesa e não há compensação financeira relacionada à sua participação na pesquisa.

Caso tenha alguma dúvida sobre a pesquisa a você poderá entrar em contato com a coordenadora responsável pelo estudo: Dra. Sirlei Costa, que pode ser localizada no consultório situado na rua Florêncio Ygartua,288/1004, em Porto Alegre (Fone: 51.3333.9409) ou telefone pessoal: (51) 99981-2122 (24 horas) ou pelo e-mail sirlei@sirleicosta.com.br. O Comitê de Ética em Pesquisa da Associação Hospitalar Moinhos de Vento - sob coordenação do Dr. Guilherme Alcides Flores Rollin, também poderá ser consultado caso a Sra. tenha alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, pelo fone (51) 3314 3537 ou no endereço: Rua Tiradentes, 198, Subsolo, Bairro Floresta, Porto Alegre, RS. CEP: 90560-030

HOSPITAL
MOINHOS DE VENTO
Instituto de Educação
e Pesquisa

Sua participação é importante e voluntária e vai gerar informações que serão úteis para o entendimento da doença, a colocar o vírus como um real problema de saúde pública, identificar a dinâmica do vírus em seres humanos e considerá-lo com evidências mais fortes que também é um fator de risco para o câncer de mama.

____________________________ ____________________

Assinatura da participante Assinatura do pesquisador

Este termo será assinado em duas vias, pela senhora e pelo responsável pela pesquisa, ficando uma via em seu poder.

____________________________ ____________________

Assinatura da participante Assinatura do pesquisador

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito do que li ou foi lido para mim, sobre a pesquisa: **"Detecção, isolamento e caracterização do vírus da leucose bovina (BLV) em tecido mamário e leucócitos humanos".** Discuti com a pesquisadora responsável Sirlei dos Santos Costa, sobre minha decisão em participar do estudo. Ficaram claros para mim os propósitos do estudo, os procedimentos, garantias de sigilo, de esclarecimentos permanentes e isenção de despesas. Sendo assim, concordo voluntariamente em participar do estudo.

NOME: ________________________________ CPF: _________________ Tel: _____________________

____________________________ Porto Alegre, ____/___/____

Assinatura do participante

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Termo de Consentimento Livre Esclarecido deste entrevistado para a sua participação neste estudo.

____________________________ Porto Alegre, ____/___/____

Sirlei dos Santos Costa

CREMERS: 10118

Suplementar 2

HOSPITAL MOINHOS DE VENTO
Instituto de Educação e Pesquisa

QUESTIONÁRIO PACIENTES

Nome:______________________________**Data:**______________________________

1. Qual a sua descendência étnica?

   ( )Brasileira ( ) Europeia ( ) Africana ( ) Asiática

2. Qual a sua Cor ou Raça autodeclarada?

( ) Brancos ( ) Pardos ( ) Indígenas ( ) Negros ( ) Amarelos

3. Qual a sua idade?

   ____

4. Qual a sua profissão?

   ____

5. Você consome carne bovina? Se sim, qual a frequência?
   ( ) sim ( ) não
   a) Frequência (/semana): ( ) 1x ( ) 2x ( )3x ( ) 4x ( )5x ou mais

   b) Ponto da carne: ( ) crua ( ) mal passada ( ) cozida

6. Você consome leite e derivados (iogurte, queijos, etc.) de origem bovina? Se sim, qual a frequência?
   ( ) sim ( ) não

   a) Frequência (/semana): ( ) 1x ( ) 2x ( )3x ( ) 4x ( )5x ou mais

   b) Ponto do leite: ( ) In natura ( ) pasteurizado ( ) UHT

7. Possui ou teve contato com animais de produção (bovinos, ovinos, etc)?

   ( ) sim ( ) não

8. Reside em área urbana ou rural?

   ( ) urbana ( ) rural

9. Costuma fazer visitas a área rural?
   ( ) sim ( ) não

10. Você tem casos de câncer em sua família?
    ( ) sim ( ) não

    a) Se sim, qual o tipo?

    ____

5 REFERÊNCIAS

AIDA, Y. et al. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. NOV, p. 1–11, 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020. Atlanta: American Cancer Society, Inc., 2019. 38 p. Disponível em: https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/breast-cancer-facts-figures.html. Acesso em: 16 fev. 2021.

ANDREOLLA, A. P. et al. Development of an indirect ELISA based on recombinant capsid protein to detect antibodies to bovine leukemia virus. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 68–75, 2018.

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**, v. 124, n. 7, p. 1342–1349, 2018.

BAREZ, P. Y. et al. Recent advances in BLV research. **Viruses**, v. 7, n. 11, p. 6080–6088, 2015.

BENIT, L.; DESSEN, P.; HEIDMANN, T. Identification, Phylogeny, and Evolution of Retroviral Elements Based on Their Envelope Genes. **Journal of Virology**, v. 75, n. 23, p. 11709–11719, 2001.

BITTNER, J. J. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. **Science**, v. 84, n. 2172, p. 2172, 1935.

BUEHRING, G. C. et al. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: a case-control study. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, 2015a.

BUEHRING, G. C. et al. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. **PLoS ONE**, v. 1, n. 1, p. 61–63, 2017.

BUEHRING, G. C. Response to “Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients”. **Breast Cancer Research**, v. 19, n. 1, p. 19–20, 2017.

BUEHRING, G. C. et al. Bovine leukemia virus discovered in human blood. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019.

BUEHRING, G. C.; KRAMME M, P.; SCHULTZ D, R. Evidence for bovine lukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. **Laboratory investigation**, v. 71, n.

3, p. 394, 1994.

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.; CHOI, K.; JENSEN, H. Bovine leukemia virus in human breast tissues. **Breast Cancer Research**, v. 3, n. S1, 2014.

BURNY, A. et al. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. **Veterinary Microbiology**, v. 17, p. 197–218, 1988.

BURRIDGE, M. J. The zoonotic potential of bovine leukemia virus. **Veterinary Research Communications**, v. 5, n. 1, p. 117–126, 1981.

CAMPEAU, P. M.; FOULKES, W. D.; TISCHKOWITZ, M. D. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. **Human Genetics**, v. 124, n. 1, p. 31–42, 2008.

CERIANI, C. et al. Bovine leukemia virus presence in breast tissue of Argentinian women. **Multidisciplinary Cancer Investigation**, v. 2, n. 4, p. 16–24, 2018.

CAVALCANTE, J. R. et al. Association of breast cancer with human papillomavirus (HPV) infection in Northeast Brazil: molecular evidence. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 73, n. 13, p. e465, 2018.

DE MARTEL, C. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: A review and synthetic analysis. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 6, p. 607–615, 2012.

DELARMELINA, E. et al. High positivity values for bovine leukemia virus in human breast cancer cases from Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, v. 15, n. 10 October, p. 1–12, 2020.

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**, v. 114, n. 12, p. 3145–3150, mar. 2017.

FERRER, J.F. et al. Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus. **Science,** v. 213, n. 4511, p. 1014-1016, 1981.

FILHO, I. R. D. B. et al. Soroprevalência de anticorpos para o vírus da Leucose Enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 511–515, 2010.

FITZMAURICE, C. et al. The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 4, p. 505–527, 2015.

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**, v. 9, p. 1102–1106, 2008.

GAETA, C. et al. Bovine leukaemia virus genotypes 5 and 6 are circulating in São Paulo. a. p. 1790–1797, 2017.

GANNON, O. M. et al. Viral infections and breast cancer – A current perspective. **Cancer Letters**, v. 420, p. 182–189, 2018.

GAO, A.; KOUZNETSOVA, V. L.; TSIGELNY, I. F. Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, n. June, p. 104417, 2020.

GHUSDAEL, J. et al. Bovine Leukemia Virus. v. 112, p. 1–19, 1984.

GILLET, N. A.; WILLEMS, L. Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. **Retrovirology**, p. 1–7, 2016.

GIOVANNA, M. et al. Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue. **Open Journal of Medical Microbiology**, v. 03, n. 01, p. 84–90, 2013.

HENZY, J. E. et al. A novel recombinant Retrovirus in the genomes of modern birds combines features of avian and Mammalian Retroviruses. **Journal of Virology**, v. 88, n. 5, p. 2398–2405, 2014.

HRON, T. et al. Remnants of an ancient *Deltaretrovirus* in the genomes of horseshoe bats (*Rhinolophidae*). **Viruses**, v. 10, n. 4, p. 185, abr. 2018.

HRON, T.; ELLEDER, D.; GIFFORD, R. J. Deltaretroviruses have circulated since at least the Paleogene and infected a broad range of mammalian species. **Retrovirology**, v. 16, n. 1, p. 33, nov. 2019.

IARC. Biological Agents. In: IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. France: IARC, 2012. v. 100B. Disponível em: https://publications.iarc.fr/119. Acesso em: 16 fev. 2021.

ICTV. Retroviridae. In: KING, A. M. Q. (ed.). ICTV 9th Report. 9th ed. [S.l.: s.n.], 2011. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/reverse-transcribing-dna-and-rna-viruses-2011/w/rt_viruses/161/retroviridae. Acesso em: 16 fev. 2021.

INCA. A situação do câncer de mama no Brasil: síntese de dados dos sistemas de informação. Rio de Janeiro: INCA, 2019. 85 p. Disponível em:

https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/situacao-do-cancer-de-mama-no-brasil-sintese-de-dados-dos-sistemas-de-informacao. Acesso em: 16 fev. 2021.

INCA. Estatísticas de Câncer. [S. l.]: INCA, 2020. Disponível em: https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer. Acesso em: 16 fev. 2021.

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**, v. 99, n. 6, p. 4586–4589, 2016.

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

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.

KHATAMI, A. et al. Bovine leukemia virus (BLV) and risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis of case-control studies. **Infectious Agents and Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2020.

KONNAI, S. et al. Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 8, p. 2163–2171, 2006.

LEONEL, M. S. Enzootic bovine leukosis. **OIE Terrestrial Manual**, v. 3, n. 1, p. 56, 2018.

MAEZAWA, M.; INOKUMA, H. Analysis of bovine leukemia virus integration sites in cattle under 3 years old with enzootic bovine leukosis. **Archives of Virology**, n. 0123456789, 2019.

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**, v. 42, n. 3, p. 171, 2005.

MENDES, E. et al. Intercorrência Entre Leucose Enzoótica e tuberculose em bovinos leiteiros do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 1–8, 2011.

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. v. 9, p. 1–9, 2007.

MIRSKY, M. L. et al. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. **Journal of virology**, v. 70, n. 4, p. 2178–83, 1996.

OH, J. K.; WEIDERPASS, E. Infection and cancer: global distribution and burden of diseases. **Annals of Global Health**, v. 80, n. 5, p. 384–392, 2014.

PANEI, C. J. 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**, v. 9, p. 1–8, 2013.

PEAR, L; TAYLO, W. Sequence specificity of retroviral proteases. **Nature**, 328,482 (1987)

PARK, S. Y.; GUO, X. Adaptor protein complexes and intracellular transport Bioscience Reports. p. 381–390, 2014.

PATARROYO, M. A.; GUTIERREZ, M. F. Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 2017, p. 3125–3130, 2017.

PLUTA, A. et al. Computational analysis of envelope glycoproteins from diverse geographical isolates of bovine leukemia virus identifies highly conserved peptide motifs. **Retrovirology**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2018.

POLAT, M. et al. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS - based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. **Retrovirology**, p. 1–23, 2016a.

POLAT, M. et al. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. **Retrovirology**, v. 13, n. 1, p. 1–23, 2016b.

POLAT, M.; TAKESHIMA, S. N.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, p. 1–16, 2017.

PORTETELLE, D. et al. Synthetic peptides approach to identification of epitopes on bovine leukeia virus envelope glycoprotein gp51. **Virology**, v. 169, n. 1, p. 34-41, 1989.

ROBINSON, M. S.; BONIFACINO, J. S. Adaptor-related proteins. **Current opinion in cell biology**, p. 444–453, 2001.

RODAKIEWICZ, S. M. et al. Heterogeneity determination of bovine leukemia virus genome in Santa Catarina. p. 1–7, 2018.

ROSEWICK, N. et al. Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. **Nature Communications**, v. 8, n. May, 2017.

SAGATA, N. et al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**, v. 82, n. February, p. 677–681, 1985.

SAITO, S. et al. Absence of bovine leukemia virus proviral DNA in Japanese human blood cell lines and human cancer cell lines. **Archives of Virology**, 2019.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd. ed. USA: Cold Spring Harbor, 2001.

SARID, R.; GAO, S. J. Viruses and human cancer: from detection to causality. **Cancer Letters**, v. 305, n. 2, p. 218–227, 2011.

SCHWARTZ, I. et al. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. **Journal of virology**, v. 68, n. 7, p. 4589–96, 1994.

SCHWARTZ, I.; LÉVY, D. L. Pathobiology of bovine leukemia virus. **Veterinary Research**, v. 25, n. 6, p. 521–536, 1994.

SCHWINGEL, D. et al. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. **Scientific Reports**, n. October 2018, p. 1–7, 2019.

STOBNICKA-KUPIEC, A. et al. Prevalence of Bovine leukemia virus (BLV) and bovine adenovirus (BAdV) genomes among air and surface samples in dairy production. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 17, n. 6, p. 312–323, 2020.

SUN, Y. et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. v. 13, 2017.

SUZUKI, T. et al. Evaluation of the δ subunit of bovine adaptor protein complex 3 as a receptor for bovine leukaemia virus. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 5, p. 1309–1316, 2003.

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**, v. 50, n. 1, p. 1–12, 2019.

WHO. **Breast cancer: prevention and control**. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index1.html#:~:text=Although breast cancer is thought,100%2C000 women in Western Europe.>.

WHO. **Breast Cancer**. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>. Acesso em: 16 fev. 2021.

WILLEMS, L. 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.

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**, v. 102, n. 22, p. 7994–7999, maio 2005.

YANG, Y. et al. Short communication : Genotyping and single nucleotide polymorphism analysis of bovine leukemia virus in Chinese dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, p. 1–5, 2019.

ZHANG, R. et al. Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. **Breast Cancer Research**, v. 18, n. 1, p. 8–9, 2016.

ZHUO, X.; FESCHOTTE, C. Cross-Species transmission and differential fate of an endogenous retrovirus in three mammal lineages. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 11, 2015.

6 Anexo A: Abordagem metagenômica em amostras de lobos marinhos (*Arctocephalus australis*) coletados na costa do Sul do Brasil

O artigo apresentado a seguir foi realizado durante o período de doutorado e será apresentado tal qual publicado na revista Infection, genetics and evolution com fator de impacto 2.611.

Infection, Genetics and Evolution 92 (2021) 104862

Contents lists available at ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Research paper

Spleen and lung virome analysis of South American fur seals (*Arctocephalus australis*) collected on the southern Brazilian coast

R. Canova [a], R.F. Budaszewski [a], M.N. Weber [b], M.S. da Silva [a], D.E. Puhl [c], L.O. Battisti [d], J. F. Soares [d], P.G. Wagner [f], A.P.M. Varela [e], F.Q. Mayer [e], C.W. Canal [a,*]

[a] *Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*
[b] *Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil*
[c] *Laboratório de Virologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil*
[d] *Laboratório Protozoologia e Riquettsioses Vetoriais, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil*
[e] *Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul (SEAPI-RS), Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil*
[f] *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Brazil*

ARTICLE INFO

Keywords:
Virome
Fur seal
HTS
Metagenomics
Pinniped

ABSTRACT

South American fur seals (*Arctocephalus australis*) are believed to reach the coast of Rio Grande do Sul (RS) through sea currents. They live in colonies and are frequently found resting on the beach. However, it is also common to find dead pinnipeds on beaches, sharing the environment with humans, domestic animals and other wild species on the coast and facilitating the transmission of pathogens. In the present study, a metagenomic approach was applied to evaluate the viral diversity in organs of fur seals found deceased along the coast of the state of RS, southern Brazil. The lungs and spleens of 29 animals were collected, macerated individually, pooled separately (one pool for lungs and another for spleens) and sequenced using the Illumina MiSeq platform. Sequences more closely related to members of the *Anelloviridae* and *Circoviridae* families were detected. Nine putative new species of anellovirus and one putative new genus, named *Nitorquevirus,* were described. Additionally, the circovirus sequences found in the lungs of *A. australis* have a common ancestor with PCV3, a proposed swine pathogen. Our study expanded the knowledge about viral communities in pinnipeds and could be useful for monitoring new viruses and potential viral sharing among wildlife, domestic animals, and humans.

1. Introduction

South American fur seals (*Arctocephalus australis*) are members of the Otariidae family belonging to the Pinnipedia superfamily that are adapted to sea life and form colonies on the shore. These animals are believed to reach the coast of Rio Grande do Sul (RS), southern Brazil, through sea currents, mainly in the winter and spring months in the Southern Hemisphere and due to the El Niño Southern Oscillation (ENSO) phenomenon (Ferreira et al., 2008). Most fur seals found on the Brazilian coast are referred to as "vagrant individuals", which are found far from their breeding sites (Ferreira et al., 2008). In addition, these animals may have contact with terrestrial animals, or that their deceased bodies might be eaten by scavenger carnivores, enabling the transmission of bacteria, viruses, fungi and parasites to domestic animals and humans. In fact, Influenza A virus have been reported in pinnipeds and the contact with the carcasses resulted in zoonotic transmission (Jr and Gray, 2012).

Little is known about the effects of infectious diseases on the health status of the fur seal population and the importance of these animals to the emergence or re-emergence of human pathogens. The microbiome of these aquatic mammals is essential for understanding the ecological, biological and evolutionary processes that these animals have undergone over the years (Grosser et al., 2019). The virome of marine mammals has already been investigated in *Zalophus californianus* species from the Northern Hemisphere (Linlin et al., 2011a, 2011b), and a metagenomic survey of the feces of *Arctocephalus tropicalis (*subantarctic fur seals) and *Arctocephalus australis* (South American fur seals) has been conducted (Kluge et al., 2016a, 2016b).

* Corresponding author at: Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.
E-mail address: claudio.canal@ufrgs.br (C.W. Canal).

https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104862
Received 29 January 2021; Received in revised form 17 March 2021; Accepted 8 April 2021
Available online 10 April 2021
1567-1348/

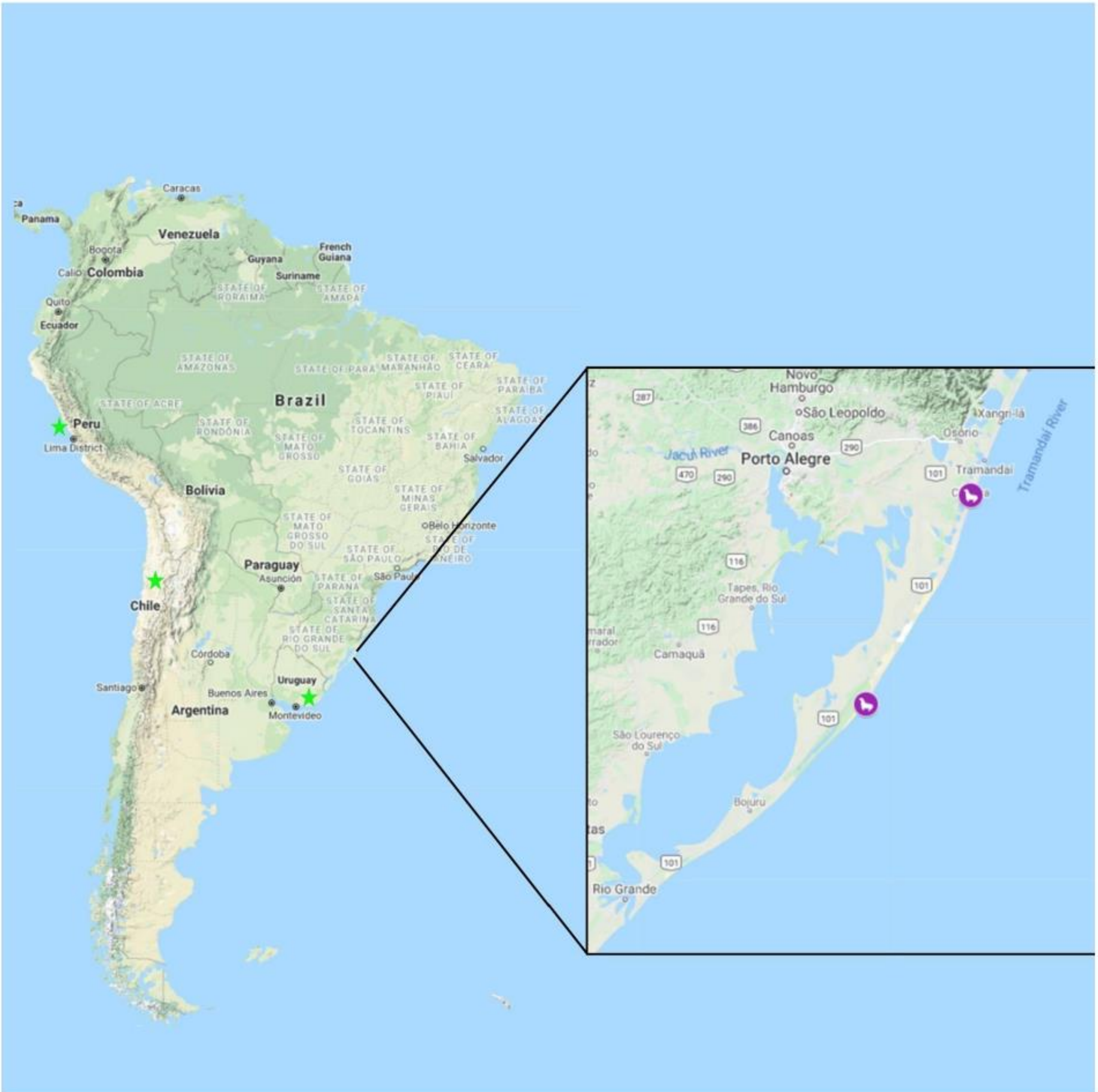

Fig. 1. Map indicating the location where the samples were collected along the coast of the State of Rio Grande do Sul, Brazil (purple icon), and the place where fur seals normally live (green star icon).

These wild mammals could share the environment with humans, domestic animals and other wild species on the coast, where they could exchange pathogens. Sea lion virus (SMSV), a calicivirus in the genus *Vesivirus,* was first isolated from California sea lions (*Zalophus californianus*) (Smith et al., 1973) and is transmissible to swine (Wilder and Dardiri, 1978) and humans (Smith et al., 2006). Other viruses, such as picobirnavirus, picornaviruses, hepevirus-like, anelovirus, parvovirus, rotavirus, sakobuvirus, sapovirus, canine distemper virus and other morbilliviruses, circovirus, adenovirus and astrovirus (Linlin et al., 2011a, 2011b), have been found in the feces of fur seals and sea lions from the Northern and Southern Hemispheres. Nevertheless, serological evidence showed that influenza A and B viruses also circulate in *Arctocephalus australis*, making monitoring important (Blanc et al., 2009).

The enhanced availability and application of high-throughput sequencing (HTS) technologies have facilitated the detection of known and novel viruses (Goodwin et al., 2016; Kohl et al., 2015; Paim et al., 2019). Moreover, metagenomic viral detection using HTS is "unbiased" since it does not require *a priori* knowledge regarding viruses or their nucleic acid sequences that might be present. Although other studies have looked for viroma in the feces of fur seals (Chiappetta et al., 2017; Kluge et al., 2016a, 2016b), our study evaluated viroma in the lungs and spleen of *Arctocephalus australis* in an extended number of animals compared with previous works.

2. Materials and methods

2.1. Study design and samples sources

Twenty-nine South American fur seals (*Arctocephalus australis*) were found dead on the Rio Grande do Sul State shore (between Cidreira and Mostardas municipalities) in August 2018 by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) team; some animals were necropsied on the spot, and others were subsequently sent to the Department of Veterinary Pathology of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Fig. 1). Lungs and spleens of the 29 animals were collected, macerated individually and diluted to 20% (*w/v*) in

Table 1
Summary of sequences that matched with the animal viruses present in the pooled spleen and lung of *Arctocephalus australis* samples.

Best blast hit (BLASTX, *E*-value $< 1 \times 10^{-3}$)	Sample	Reads	No. of contigs	Contigs lengths	Amino acid identity range[a]
Anelloviridae	Spleen	21,900	111	79–2523	37.6–99%
Anelloviridae	Lungs	168	12	208–561	34.72–94.4%
Circoviridae	Lungs	1026	2	1115–1621	63.1–65.8%

[a] Analysis performed in BLASTX tool, from GenBank database.

phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.2), centrifuged at low speed (1800 ×*g* for 30 min), filtered through a 0.22-μm filter for the removal of small debris, pooled separately (one pool for lungs and other for spleen) and stored at −80 °C for posterior analysis. All of the samples from this study were collected in strict accordance with Brazilian law, and the license for collecting zoological material was granted by SISBIO/Ministry of the Environment (license number: 61987-1).

2.2. Viral metagenomics and HTS

Samples of all 29 spleens were assembled into one pool, and all 29 samples of lungs were assembled into another pool, both containing 500 μL of each prepared organ. For each pool, a total of 14.5 mL was passed through a 0.22 μm filter and subsequently centrifuged on a 25% sucrose cushion at 150,000 g for 3 h at 4 °C in a Sorvall AH629 rotor. The pellets containing the viral particles were incubated for 1.5 h with DNase and RNase enzymes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Thurber et al., 2009). Subsequently, total RNA and DNA were isolated using TRI reagent® (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and a standard phenol-chloroform protocol (Sambrook and Russel, 2001), respectively. The viral DNA was enriched using the Genoplex® Complete Whole Genome Amplification (WGA) kit (Sigma-Aldrich) according to the

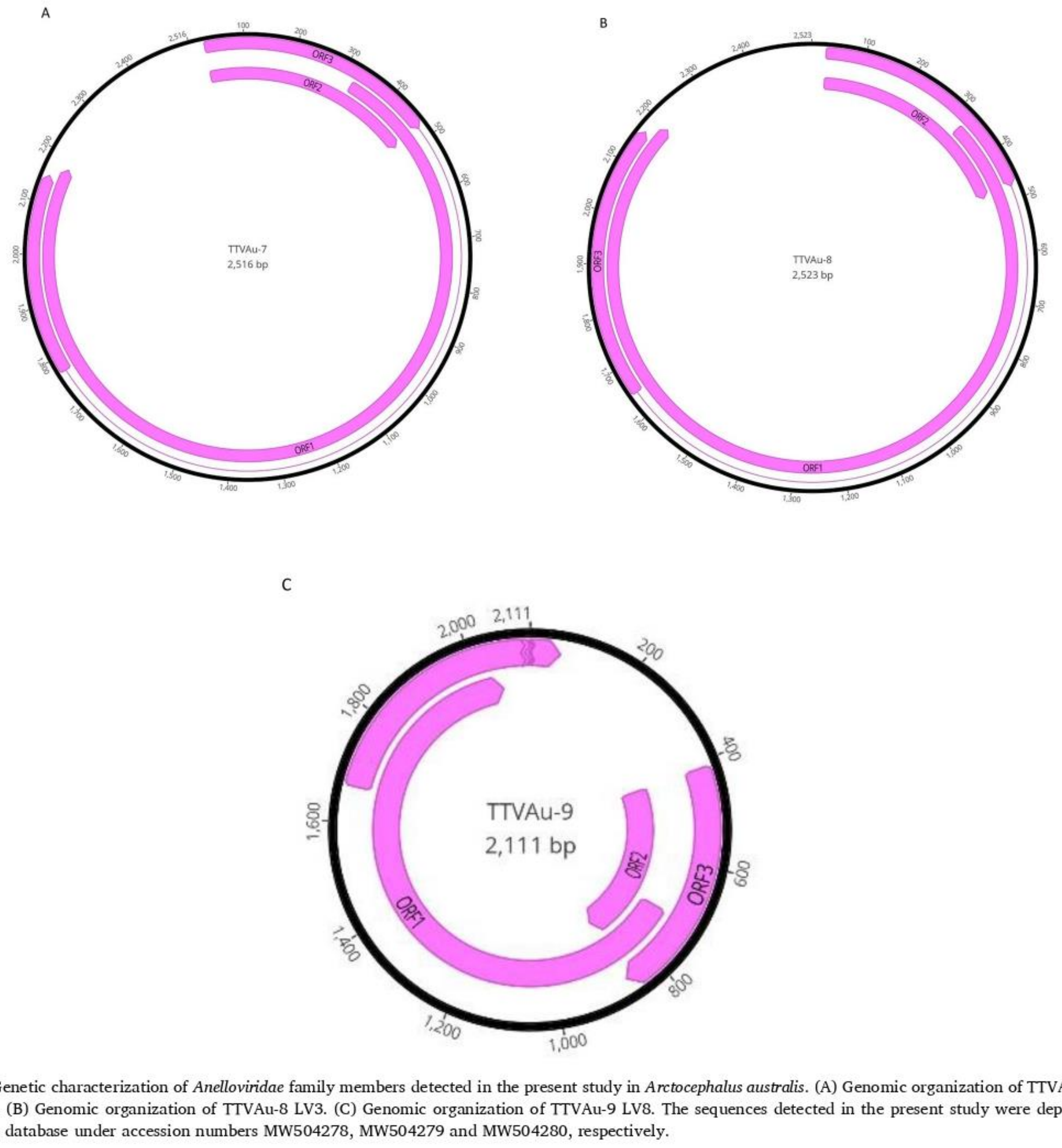

Fig. 2. Genetic characterization of *Anelloviridae* family members detected in the present study in *Arctocephalus australis*. (A) Genomic organization of TTVAu-7 LV2 detected. (B) Genomic organization of TTVAu-8 LV3. (C) Genomic organization of TTVAu-9 LV8. The sequences detected in the present study were deposited in GenBank database under accession numbers MW504278, MW504279 and MW504280, respectively.

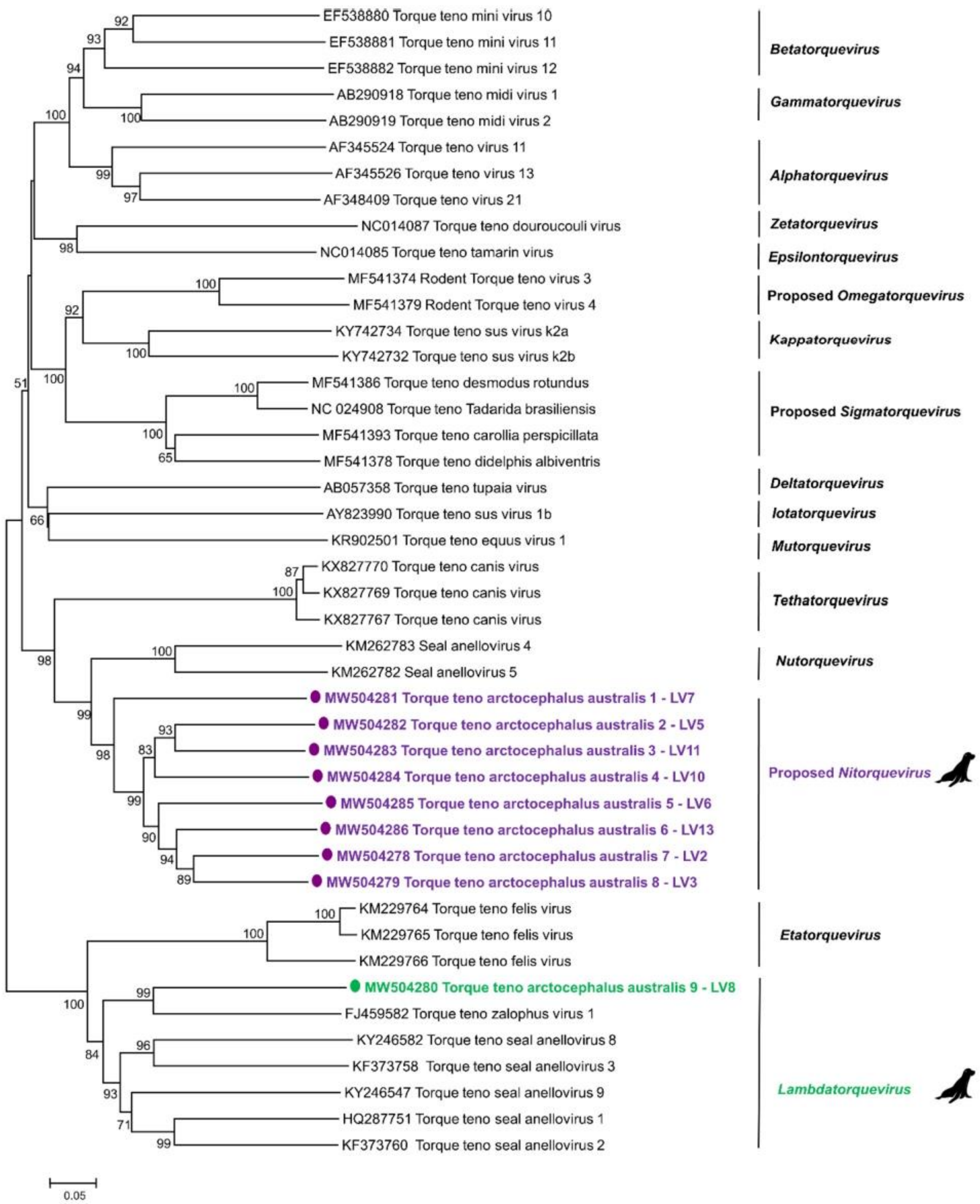

Fig. 3. Nucleotide phylogenetic tree of the complete ORF1 gene, highlighting the sequences obtained in the present study. The sequences were analyzed through the maximum-likelihood method with the JTT + G + *I* model. All of the analyses were conducted with 1000 bootstrap replications, and the percentage of replicate trees in which the sequences clustered together is presented adjacent to the branches. Bootstrap values for each node are shown if they were > 50%. The sequences detected in the present study have been marked with ● for sequences detected in *Arctocephalus australis* and were deposited in GenBank under accession numbers MW504281, MW504282, MW504283, MW504284, MW504285, MW504286, MW504278, MW504279 and MW504280.

Table 2
Summary of *Anelloviridae* family-related sequences reported in the present study, reporting host of origin, ORF1 size, and nucleotide identity of the ORF1 gene between them.

Sequence name	Host	ORF1 size (aa)	Nucleotide identity								
			LV07	LV05	LV11	LV10	LV06	LV13	LV02	LV03	LV08
LV07	*Arctocephalus australis*	623	100.00								
LV05	*Arctocephalus australis*	616	48.8	100.00							
LV11	*Arctocephalus australis*	610	50.2	62.9	100.00						
LV10	*Arctocephalus australis*	614	53.5	52.9	55.0	100.00					
LV06	*Arctocephalus australis*	625	49.8	52.3	52.9	54.9	100.00				
LV13	*Arctocephalus australis*	456	47.4	52.0	51.2	51.2	55.5	100.00			
LV02	*Arctocephalus australis*	616	49.2	51.3	53.2	52.3	56.4	62.3	100.00		
LV03	*Arctocephalus australis*	624	50.3	53.1	55.1	55.1	58.9	64.3	67.7	100.00	
LV08	*Arctocephalus australis*	446	21.9	20.2	21.0	19.5	21.1	18.1	20.6	20.1	100.00

manufacturer's recommendations. Furthermore, viral RNA was reverse-transcribed using a TransPlex® Complete Whole Transcriptome Amplification (WTA) kit (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's recommendations. The double-stranded DNA products produced from these enrichment protocols were pooled in equimolar amounts and purified using the PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo kits (Thermo Fisher Scientific). The quality and quantity of the DNA were assessed through spectrophotometry and fluorometry performed with NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) and Qubit™ (Thermo Fisher Scientific), respectively. The DNA libraries were further prepared with 50 ng of purified DNA using the Nextera XT DNA sample preparation kit (2 × 150 paired-end reads with the Illumina v2 reagent kit) and sequenced using an Illumina MiSeq platform.

2.3. Bioinformatic analysis

The quality of the sequences generated was evaluated using FastQC. Furthermore, the sequences with bases possessing a Phred quality score < 20 were trimmed with the aid of Geneious Prime software (2020.1.2). The paired-end sequence reads were *de novo* assembled into contigs with SPAdes Assembler software, version 3.11.1 (Bankevich et al., 2012). All of the assemblies were confirmed by mapping reads to contigs produced by the SPAdes Assembler, using Geneious Prime software. Thereafter, the assembled contigs were examined for similarities with known sequences by BLASTX software using Blast2GO (Gotz et al., 2008). Sequences with *E*-values $\leq 10^{-3}$ were classified as likely to have originated from eukaryotic viruses, bacteria, phages, or unknown sources, a conclusion reached based on the taxonomic origin of the sequence with the best *E*-values. Gene and protein comparisons were performed with the BLASTN and BLASTP programs, respectively (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Sequences representative of viruses belonging to the families *Anelloviridae* and *Circoviridae* were obtained from GenBank and aligned with the sequences identified in the present study with MAFFT software (Katoh and Standley, 2013) using nucleotide and deduced amino acid sequences, respectively. Phylogenetic trees were constructed using MEGA6 (Tamura et al., 2013). For the classification of anelloviruses, the complete ORF1 was used, and the phylogenetic tree was constructed using the maximum-likelihood method with the JTT + G + *I* model. For the classification of circoviruses, the phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of the partial rep gene sequence was constructed using the neighbor-joining with Poisson method.

3. Results

3.1. Overview

We collected 29 spleen and lung samples, pooled each organ and sequenced them on the Illumina MiSeq platform, which generated 83,712 and 624,924 reads in the spleen and lung pools, respectively. The 4285 (spleen) and 11,364 (lung) assembled sequence contigs produced with SPAdes Assembler software, version 3.11.1 (Bankevich et al., 2012), were compared with the viral reference database and the GenBank nonredundant protein database through a BLASTX search conducted with an *E*-value cutoff of 10^{-5} in Blast2GO (Gotz et al., 2008). In the spleen, exogenous eukaryotic virus-related sequences comprised 2.6% (111/4285) of the sequences, and in the lung pool, they comprised 0.12% (14/11,364) of the sequences. Viral sequences belonging to *Anelloviridae* and *Circoviridae* were observed (Table 1).

3.2. *Anelloviridae*

A total of 111 sequences from the spleen and 12 from the lung closely associated with *Anelloviridae* members were observed (Table 1). The contigs ranged between 79 and 2523 nt in length, and three complete genomes (Fig. 2A–C) and six additional sequences displaying the complete ORF1 gene (Fig. 2) were obtained. The complete ORF1 is used as a demarcation criterion for the classification of new genera and species (Biagini et al., 2019).

The sequences were classified, and we putatively named the proposed species Torque teno *Arctocephalus australis* 1 (TTVAu-1), TTVAu-2, TTVAu-3, TTVAu-4, TTVAu-5, TTVAu-6, TTVAu-7, TTVAu-8 and TTVAu-9. According to ICTV guidelines, pairwise nucleotide identities in ORF1 greater than 35% and 56% denoted the same anellovirus species and genus, respectively (Biagini et al., 2019). Following these criteria, eight putative new *Anelloviridae* species (TTVAu-1 to -8) belonging to one putative new genus, *Nitorquevirus* (Fig. 3), were characterized, while TTVAu-9 belongs to the *Lambdatorquevirus* genus, closely related to *Torque teno zalophus virus 1*.

From the three whole genome sequences obtained, two belonged to a proposed genus putatively named *Nitorquevirus* (TTVAu-7 isolate LabVir 2 and TTVAu-8 isolate LV3), and one was classified as *Lambdatorquevirus* (TTVAu-9 isolate LV8) (Fig. 2A–C). The genomes displayed a typical *Anelloviridae* organization comprised of a circular single-stranded DNA genome containing 2516 nucleotides (nt) and 46.3% C + G content (TTVAu-7- LV2) (Fig. 2A); 2523 nt and 46.8% C + G content (TTVAu-8 - LV3) (Fig. 2B); and 2111 nt and 47% C + G content (TTVAu-9 - LV8) (Fig. 2C). The TTVAu-7-LV2 presents an untranslated intergenic region comprising 336 nucleotides, putative ORF1 (nt 324–2175) and ORF2 genes (nt 26–481), and an ORF3 gene divided into two intervals (nt 26–478 and 1772–2152); the TTVAu-8-LV3 presents an untranslated intergenic region comprising 349 nucleotides, putative ORF1 (nt 325–2199) and ORF2 genes (nt 26–478), and an ORF3 gene divided into two intervals (nt 26–475 and 1646–2167), and the TTVAu-9-LV8 presents an untranslated intergenic region comprising 410 nucleotides, putative ORF1 (nt 712–2052) and ORF2 genes (nt 411–866), and an ORF3 gene divided into two intervals (nt 411–863 and 1667–2156).

The phylogenetic analysis of translated ORF1 (Fig. 3) showed that TTVAu-1 to -8 were grouped into a separate cluster supported by a 99% bootstrap value, more closely related to aneloviruses previously detected in seals, classified as *Nutorquevirus*. Together with pairwise identity values (Table 2), this cluster could be classified as a new genus, proposed

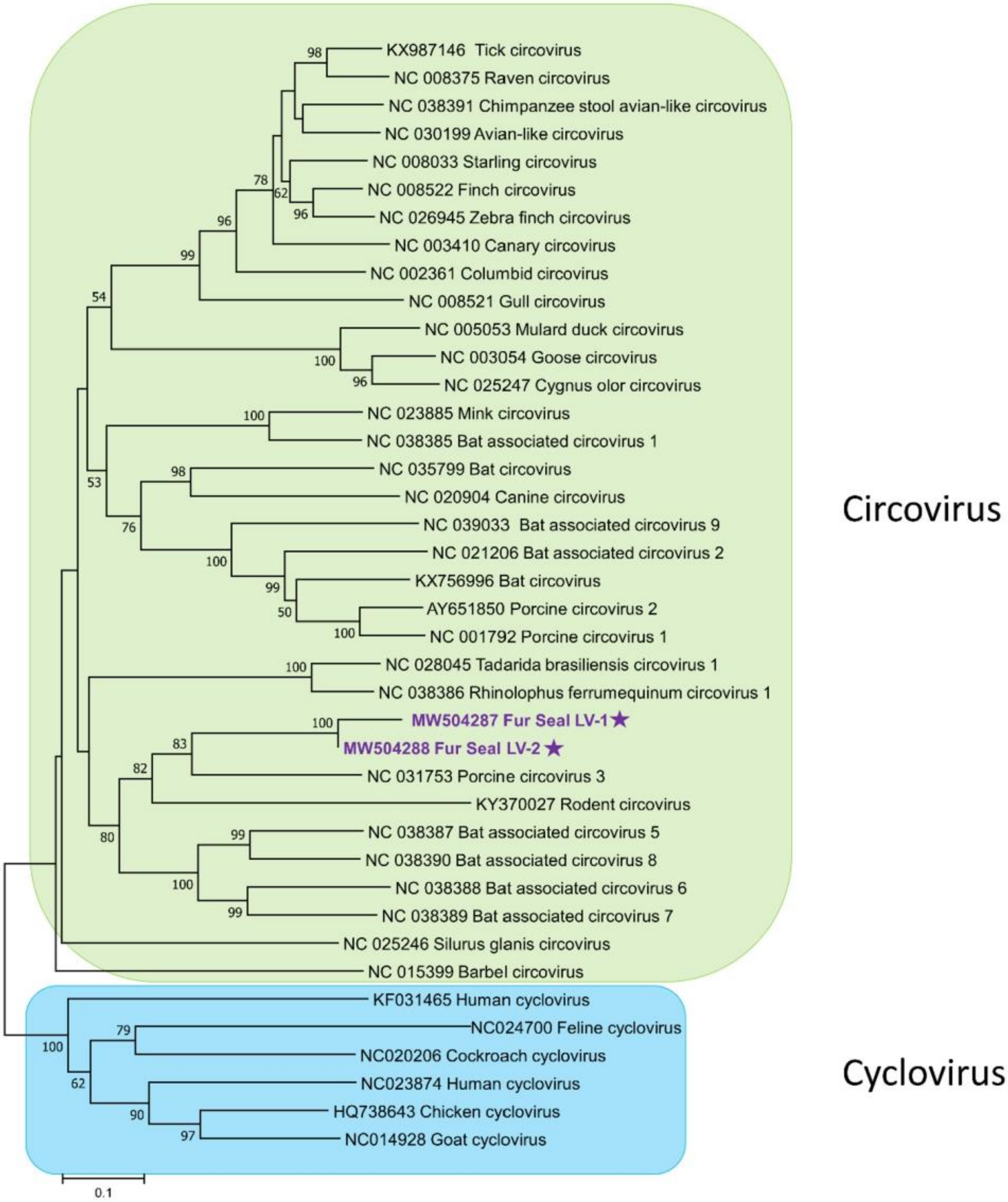

Fig. 4. Amino acid phylogenetic tree of the complete rep, gene highlighting the sequences obtained in the present study. The sequences were analyzed through the neighbor-joining method with the Poisson model. All of the analyses were conducted with 1000 bootstrap replications, and the percentage of replicate trees in which the sequences clustered together is presented adjacent to the branches. Bootstrap values for each node are shown if they were > 50%. The sequences detected in the present study have been marked with ● for sequences detected in *Arctocephalus australis* and were deposited in GenBank under accession numbers MW504287 and MW504288, respectively.

as *Nitorquevirus*. As also suggested by pairwise identities, we could also classify each isolate as a separate species, as confirmed by the tree topology. Interestingly, strain LV8 was highly divergent from the other TTVs detected in the present study and closely related to members of the *Lambdatorquevirus* genus, which also contains anelloviruses detected in seals. Our isolate was most closely related to *Torque teno zalophus* 1 (accession number FJ459582), detected in lung tissue of captive California sea lions (*Zalophus californianus*) after an event of mortality between 2005 and 2006 in Kansas City Zoo, Missouri, USA (Ng et al., 2009).

3.3. *Circoviridae*

The genome organization of *Circoviridae* comprises a circular single-stranded DNA genome containing 1.7- to 2.1-kb nucleotides (nt) with replicase (rep) and capsid (cap) genes. Two sequences related to circoviruses were detected and retrieved from lung samples. The two contigs, named Fur Seal LV-1 and Fur Seal LV-2, ranged between 1115 and 1621 nt in length (Table 1), and it was possible to detect the rep and cap genes in both contigs. Fur Seal LV-1 presented the complete replicase (rep) with 822 nt and capsid (cap) genes with 732 nt; in LV-2, a partial rep (342 nt) and complete cap with 732 nt were obtained. A BLASTX search showed that both sequences were closer to the rep sequences of members of the *Circovirus* genus, sharing 43% amino acid identity between them. Fur Seal LV-1 shares 66% amino acid identity with porcine circovirus 3 (PCV-3) (GenBank accession number NC 031753.1), while Fur Seal LV-2 shares 29% amino acid identity with PCV3.

A complete rep amino acid phylogenetic analysis was performed using the sequences found in the present work and representative sequences from the *Circoviridae* family (Fig. 4). The phylogenetic reconstruction presented two separated clusters corresponding to the *Circovirus* and *Cyclovirus* genera. Fur seals LV-1 and LV-2 grouped closely with PCV-3 (GenBank accession number NC 031753).

4. Discussion

In the present study, new anellovirus-related species DNA were detected in pinniped lungs and spleens, and circovirus DNA was detected in lungs. Anelloviruses are small, nonenveloped, circular ssDNA viruses belonging to the *Anelloviridae* family. Anellovirus-related sequences were the most abundant viral sequences detected in the HTS applied in the present study. The predominance of anelloviruses detected in the spleen and lungs agrees with a previous study where anellovirus were also detected in feces from South American fur seals (Kluge et al., 2016a, 2016b) and buccal swabs from Antarctic fur seals (Crane et al., 2018). Moreover, we obtained three complete genomes (Fig. 2A–C) and six additional sequences that displayed the complete ORF1 gene, comprising one putative new genus and nine new species within the *Anelloviridae* family. In most mammals, anelloviruses are not implicated in specific diseases. However, evidence suggests that, in California captive sea lions, a new anellovirus (California sea lion anellovirus – ZcAV) could be a cause of death since all three sea lions that died were also positive for ZcAV, and the double-stranded replicative form of ZcAV was also found (Ng et al., 2009). However, it is not clear if this virus was associated with the death of the fur seals reported in the present study.

The members of the *Anelloviridae* family are known to infect a broad range of hosts, mainly mammals, such as primates, dogs, cats, pigs, rodents, bats and seals, often without clinical signs (de Souza et al., 2018). A comprehensive characterization of the natural hosts of anelloviruses is central to understanding their host range and the nature of their transmission dynamics. The sequences described here from nine new species formed a single cluster; as a result, a new genus is proposed, putatively named *Nitorquevirus* (Fig. 3). The present study expands the host range of this viral family and suggests that novel anelloviruses of marked diversity circulate in fur seals.

Phylogenetic analyses revealed the circulation of two new circoviruses in South American fur seals. The deduced amino acid sequences of circoviruses detected in the samples Fur Seal LV-1 and Fur Seal LV-2 were similar to other sequences of members in the *Circovirus* genus (Fig. 4), which contains different members known to infect multiple animal species (Linlin et al., 2010, Linlin et al., 2011a). Our sequences are similar to each other and have a common ancestor with PCV3, a recently described circovirus known to infect swine and wild boars (Klaumann et al., 2018; Palinski et al., 2017). Information regarding circoviruses in pinnipeds is scarce, but a recent study also performed with *A. australis* feces found circoviruses genetically distant from those described in the present study (Chiappetta et al., 2017) (Fig. 4). It is not known whether these viruses are capable of infecting other species and whether they can cause diseases in fur seals. Our data expand the knowledge about circovirus members and their evolutionary relationships.

In conclusion, the present study demonstrated the description and characterization of new and known viruses using a viral metagenomics approach, expanding the understanding of viral diversity in aquatic mammals. Our study described nine putative new species of anellovirus that comprise one putative new genus putatively, named *Nitorquevirus,* that is present in the lungs and spleen of the South American fur seal. Additionally, we also reported two circovirus species present in the lungs of the South American fur seal that have a common ancestor with PCV3, a putative swine pathogen. These results could be useful to improve our knowledge of the host range of these viruses. Further studies to detect viral agents in pinnipeds could provide a better understanding of the viruses that might be present that will allow us to monitor the emergence of new viruses and the potential viral sharing among wildlife, domestic animals, and humans.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)- Finance Code 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Propesq/UFRGS) supported this study.

References

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V. M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. J. Comput. Biol. 19, 455–477. https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021.

Biagini, P., Bendinelli, M., Hino, S., Mankertz, A., Niel, C., Okamoto, H., Raidal, S., Teo, C.G., Todd, D., 2019. ICTV Taxonomy [WWW Document]. ICTV Ninth Report; 2009 Taxon. Release. URL. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/ssdna-viruses-2011/w/ssdna_viruses/139/anelloviridae. accessed 4.1.21.

Blanc, A., Ruchansky, D., Clara, M., Achaval, F., Le Bas, A., Arbiza, J., 2009. Serologic evidence of influenza A and B viruses in South American fur seals (*Arctocephalus australis*). J. Wildl. Dis. 45, 519–521. https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.2.519.

Chiappetta, C.M., Cibulski, S.P., Lima, F.E.S., Varela, A.P.M., Amorim, D.B., Tavares, M., Roehe, P.M., 2017. Molecular detection of circovirus and adenovirus in feces of Fur seals (Arctocephalus spp.). Ecohealth 14, 69–77. https://doi.org/10.1007/s10393-016-1195-8.

Crane, A., Goebel, M.E., Kraberger, S., Stone, A.C., Varsani, A., 2018. Novel anelloviruses identified in buccal swabs of Antarctic fur seals. Virus Genes 54, 719–723. https://doi.org/10.1007/s11262-018-1585-9.

de Souza, W.M., Fumagalli, M.J., de Araujo, J., Sabino-Santos, G., Maia, F.G.M., Romeiro, M.F., Modha, S., Nardi, M.S., Queiroz, L.H., Durigon, E.L., Nunes, M.R.T., Murcia, P.R., Figueiredo, L.T.M., 2018. Discovery of novel anelloviruses in small mammals expands the host range and diversity of the Anelloviridae. Virology 514, 9–17. https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.11.001.

Ferreira, J.M., De Oliveira, L.R., Wynen, L., Bester, M.N., Guinet, C., Moraes-Barros, N., Martins, F.M., Muelbert, M.M.C., Moreno, I.B., Siciliano, S., Ott, P.H., Morgante, J.S., 2008. Multiple origins of vagrant Subantarctic fur seals: a long journey to the Brazilian coast detected by molecular markers. Polar Biol. 31, 303–308. https://doi.org/10.1007/s00300-007-0358-z.

Goodwin, S., McPherson, J.D., McCombie, W.R., 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. Nat. Rev. Genet. 17, 333–351. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49.

Gotz, S., Garcia-Gomez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J., Robles, M., Talon, M., Dopazo, J., Conesa, A., 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. Nucleic Acids Res. 36, 3420–3435. https://doi.org/10.1093/nar/gkn176.

Grosser, S., Sauer, J., Paijmans, A.J., Caspers, B.A., Forcada, J., Wolf, J.B.W., Hoffman, J. I., 2019. Fur seal microbiota are shaped by the social and physical environment, show mother–offspring similarities and are associated with host genetic quality. Mol. Ecol. 28, 2406–2422. https://doi.org/10.1111/mec.15070.

Jr, J.F.X.W., Gray, G.C., 2012. Marine Mammal Zoonoses: A Review of Disease Manifestations, pp. 521–535. https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01492.x.

Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Mol. Biol. Evol. 30, 772–780. https://doi.org/10.1093/molbev/mst010.

Klaumann, F., Correa-Fiz, F., Franzo, G., Sibila, M., Núñez, J.I., Segalés, J., 2018. Current knowledge on Porcine circovirus 3 (PCV-3): a novel virus with a yet unknown impact on the swine industry. Front. Vet. Sci. 5, 1–13. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00315.

Kluge, M., Campos, F.S., Tavares, M., de Amorim, D.B., Valdez, F.P., Giongo, A., Roehe, P.M., Franco, A.C., 2016a. Metagenomic survey of viral diversity obtained from feces of Subantarctic and South American Fur seals. PLoS One 11, e0151921. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151921.

Kluge, M., Campos, F.S., Tavares, M., de Amorim, D.B., Valdez, F.P., Giongo, A., Roehe, P.M., Franco, A.C., 2016b. Metagenomic survey of viral diversity obtained from feces of Subantarctic and south American Fur seals. PLoS One 11, e0151921. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151921.

Kohl, C., Nitsche, A., Kurth, A., 2015. Metagenomics-driven virome: current procedures and new additions. Br. J. Virol. 2, 96–101. https://doi.org/10.17582/journal.bjv/2015.2.6.96.101.

Linlin, Li, Kapoor, A., Slikas, B., Bamidele, O.S., Wang, C., Shaukat, S., Masroor, M.A., Wilson, M.L., Ndjango, J.-B.N., Peeters, M., Gross-Camp, N.D., Muller, M.N., Hahn, B.H., Wolfe, N.D., Triki, H., Bartkus, J., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2010. Multiple Diverse circoviruses Infect Farm Animals and Are Commonly Found in Human and Chimpanzee Feces. J. Virol. 84, 1674–1682.

Linlin, Li, Shan, T., Soji, O.B., Alam, M.M., Kunz, T.H., Zaidi, S.Z., Delwart, E., 2011a. Possible cross-species transmission of circoviruses and cycloviruses among farm animals. J. Gen. Virol. 92, 768–772. https://doi.org/10.1099/vir.0.028704-0.

Linlin, Li, Shan, T., Wang, C., Côté, C., Kolman, J., Onions, D., Gulland, F.M.D., Delwart, E., 2011b. The fecal viral flora of California sea lions. J. Virol. 85, 9909–9917. https://doi.org/10.1128/jvi.05026-11.

Ng, T.F.F., Suedmeyer, W.K., Wheeler, E., Gulland, F., Breitbart, M., 2009. Novel anellovirus discovered from a mortality event of captive California sea lions. J. Gen. Virol. 90, 1256–1261. https://doi.org/10.1099/vir.0.008987-0.

Paim, W.P., Weber, M.N., Cibulski, S.P., da Silva, M.S., Puhl, D.E., Budaszewski, R.F., Varela, A.P.M., Mayer, F.Q., Canal, C.W., 2019. Characterization of the viral genomes present in commercial batches of horse serum obtained by high-throughput sequencing. Biologicals 61, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.08.005.

Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., Byers, E., Hause, B.M., 2017. A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. J. Virol. 91, 1–13. https://doi.org/10.1128/jvi.01879-16.

Sambrook, J., Russel, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, USA.

Smith, A.W., Akers, T.G., Madin, S.H., Vedros, N.A., 1973. San Miguel sea lion virus isolation, premiliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus. Nat. Phys. Sci. 241, 20. https://doi.org/10.1038/246421a0.

Smith, A.W., Iversen, P.L., Skilling, D.E., Stein, D.A., Bok, K., Matson, D.O., 2006. Vesivirus viremia and seroprevalence in humans. J. Med. Virol. 55, 52–55. https://doi.org/10.1002/jmv.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 30, 2725–2729. https://doi.org/10.1093/molbev/mst197.

Thurber, R.V., Haynes, M., Breitbart, M., Wegley, L., Rohwer, F., 2009. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. Nat. Protoc. 4, 470–483. https://doi.org/10.1038/nprot.2009.10.

Wilder, F.W., Dardiri, A.H., 1978. San Miguel Sea lion virus fed to mink and pigs. Can. J. Comp. Med. 42, 200–204.