

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

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

Elaborado por: Juliana do Canto Olegário
Acadêmica em Medicina Veterinária

**Porto Alegre
2020/1**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

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

Autora: Juliana do Canto Olegário

**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para a
obtenção da graduação em Medicina
Veterinária**

Orientador: Cláudio Wageck Canal
Coorientadora: Raíssa Canova

PORTO ALEGRE

2020/1

Juliana do Canto Olegário

VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA EM TECIDO MAMÁRIO E LEUCÓCITOS HUMANOS

Aprovado em 25 NOV 2020

APROVADO POR:

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

Prof. Dr. Matheus Nunes Weber
Membro da Comissão

Prof. Dr. Mauro Riegert Borba
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família. À minha mãe, Ilza, ao meu pai, Assis, e à minha irmã e minha metade, Isadora, por estarem comigo desde o dia em que nasci até o momento de incerteza que foi sair de outra faculdade para tentar entrar na Medicina Veterinária da UFRGS, e continuarem me motivando durante toda a minha jornada. Vocês três são a minha maior inspiração na vida. À minha dinda, Flávia, à minha tia-avó Lúcia e à minha avó, Maria Augusta, por me apoiarem sempre. À minha tia e médica veterinária, Sílvia, por me influenciar a seguir essa profissão e sempre torcer por mim, mesmo à distância. Ao meu padrasto, Sérgio, pelo carinho e apoio desde o primeiro momento em que nos conhecemos. Aos meus irmãos felinos, Lelé e Cléo, por serem meus primeiros pacientes e me ensinarem sobre o amor que apenas seres de quatro patas conseguem proporcionar.

Ao Bernardo, meu melhor amigo e namorado, obrigada pelo amor, carinho e incentivo infinitos, e pela contribuição diária e imensurável para o meu crescimento pessoal. Não tenho palavras para expressar as mudanças positivas que aconteceram na minha vida depois de te conhecer. Aos meus “amigos do Discord”, um imenso obrigada pelos momentos de distração, pelas risadas, pelos almoços no RU, pelos cafés da tarde, pelas festas, pelas conversas, pelas tardes na piscina, pelas noites de jogos, pelas horas consecutivas assistindo vídeos e séries, por me fazerem companhia virtual durante a quarentena, por serem meu motivo de alegria em muitos momentos e por estarem sempre me apoiando. Não sei o que seria de mim sem vocês.

Às minhas amigas da faculdade, Veterigatas, obrigada por estarem ao meu lado nessa montanha-russa chamada Medicina Veterinária durante todos esses anos, por me fazerem companhia nos momentos de desespero e de felicidade, por alegrarem minhas manhãs e tardes, por tornarem a minha experiência na graduação infinitamente melhor e por me propiciarem caminhar ao lado de pessoas tão incríveis. À equipe maravilhosa da Virologia Veterinária, que me acompanha desde o quinto semestre, obrigada por serem meus professores fora da sala de aula e me proporcionarem um aprendizado incomparável, pelo choro coletivo entre experimentos que davam errado, pelos momentos de descontração, pelas festas de Halloween e por sempre acreditarem em mim e me incentivarem. Um obrigada especial à minha coorientadora e amiga, Raíssa, por sugerir que o assunto do meu TCC fosse inspirado no seu projeto de doutorado e me guiar nesse processo, e ao meu orientador, Cláudio Canal, por ter me acolhido no laboratório e ter acreditado no meu potencial.

RESUMO

O vírus da leucose bovina (BLV), membro da família *Retroviridae* e do gênero *Deltaretrovirus*, é um vírus envelopado de RNA fita simples e é o agente etiológico da leucose enzoótica bovina. Ele infecta células do sistema imune, da glândula mamária e células endoteliais dos bovinos. Os animais acometidos podem ser assintomáticos, apresentar linfocitose persistente ou desenvolver linfomas de células B em diversos órgãos, o que corresponde à forma clínica e mais grave da doença e a qual acontece em 0,1-10% dos casos. Além dos bovinos, o vírus pode infectar inúmeros outros mamíferos, como búfalos, capivaras, ovelhas e cabras, de forma natural ou experimental. Existem cada vez mais evidências de que os humanos também são passíveis de infecção pelo BLV e de que ele pode estar associado ao desenvolvimento de câncer de mama em mulheres. O DNA viral já foi detectado em tecido mamário tanto com alterações malignas ou pré-malignas como sem alterações (ou seja, benigno), além de no sangue e em carcinoma de células escamosas de pulmão de humanos, e a proteína do capsídeo (p24) já foi identificada no tecido mamário de mulheres. Mais de um estudo conseguiu correlacionar significativamente a presença do DNA do vírus com o desenvolvimento de câncer de mama. Assim como os outros deltaretrovírus, o BLV codifica a proteína Tax, que regula a transcrição viral e está implicada no papel oncogênico do vírus, podendo ser a responsável pela transformação maligna das células mamárias de mulheres. O BLV está presente tanto no leite como na carne provenientes de bovinos infectados, e especula-se que a principal rota de contaminação para humanos seja através da alimentação com produtos de origem bovina que não receberam tratamento térmico adequado (pasteurização ou cozimento). O objetivo deste trabalho de conclusão de curso é realizar uma revisão bibliográfica sobre o assunto, compilando resultados e trazendo atenção para um tema novo e importante que tem impacto significativo na saúde pública e pode ajudar a elucidar a etiologia multifatorial do tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo.

Palavras-chave: retrovírus. BLV. leucose bovina. câncer de mama. zoonose.

ABSTRACT

Bovine leukemia virus (BLV), a member of the Retroviridae family and the Deltaretrovirus genus, is an enveloped ssRNA virus that causes enzootic bovine leucosis. BLV infects immune cells, mammary epithelial cells and endothelial cells of cattle. Affected animals may be asymptomatic, present with persistent lymphocytosis or develop malignant B-cell lymphoma in several organs, which is the most severe and clinical form of the disease and occurs in only 0,1-10% of cases. In addition to cattle, the virus can infect several other mammals, including buffaloes, capybaras, sheep and goats, naturally or experimentally. There is increasing evidence that humans are also susceptible to BLV infection and that it may be associated with the development of breast cancer in women. Viral DNA has been detected in both mammary tissues with malignant or premalignant changes and unchanged tissues (i.e. benign), as well as in blood and lung squamous cell carcinoma in humans, and the capsid protein (p24) has been identified in mammary tissue of women. Several studies were able to significantly correlate the presence of viral DNA with breast cancer development. Like other deltaretroviruses, BLV encodes the Tax protein, which regulates viral transcription and is implicated in its oncogenic role, and may be responsible for the malignant transformation of mammary cells in women. The virus is present in both milk and meat from infected cattle, and it is speculated that the main route of contamination for humans is through feeding of bovine products that have not received adequate heat treatment (pasteurization or cooking). The objective of this work is to carry out a review, compiling results and bringing attention to this new and important subject that has a significant impact on public health and can help elucidate the multifactorial etiology of the most common type of cancer in women worldwide.

Keywords: retrovirus. BLV. bovine leucosis. breast cancer. zoonosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Subfamílias e gêneros virais da família <i>Retroviridae</i>	11
Figura 2 –	Espécies virais do gênero <i>Deltaretrovirus</i>	12
Figura 3 –	Organização genômica e estrutura da partícula viral do BLV.....	13
Figura 4 –	Árvore filogenética dos 10 genótipos descritos para o BLV baseada em sequências parciais do gene env.....	19
Figura 5 –	Estimativa da incidência de casos de câncer para 2020 em mulheres no Brasil.....	21
Figura 6 –	Evolução da taxa de mortalidade de câncer de mama em mulheres no Brasil entre 1980 e 2016.....	22
Figura 7 –	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.....	29

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Experimentos realizados para detecção de anticorpos anti-BLV, DNA ou proteínas virais em amostras humanas..... 25
- Tabela 2** – Experimentos que tentam relacionar a presença do DNA do BLV em tecido mamário de mulheres com o diagnóstico de câncer de mama..... 37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA.....	11
2.1	Biologia e Classificação.....	11
2.2	Genoma e Proteínas Virais.....	12
2.3	Replicação Viral.....	14
2.4	Leucose Enzoótica Bovina.....	16
2.5	Transmissão Viral.....	17
2.6	Genótipos Virais.....	18
2.7	Frequência Populacional do BLV.....	20
3	CÂNCER DE MAMA EM MULHERES.....	21
4	VÍRUS E CÂNCER EM HUMANOS.....	24
5	BLV EM HUMANOS.....	25
5.1	Deteção de Anticorpos Séricos Anti-BLV.....	26
5.2	Deteção do BLV no Tecido Mamário.....	27
5.3	Deteção do BLV no Sangue.....	30
5.4	Ausência de Deteção do BLV.....	31
5.5	Transmissão do BLV para Humanos.....	32
6	BLV E CÂNCER DE MAMA EM MULHERES.....	34
6.1	BLV e Outros Tipos de Câncer.....	38
6.2	Transformação Celular.....	38
7	CONCLUSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

Os membros da família *Retroviridae* (*Realm: Riboviria; Kingdom: Pararnavirae; Filo: Artverviricota; Classe: Revtraviricetes; Ordem: Ortevirales*) são amplamente distribuídos como agentes infecciosos exógenos de vertebrados e estão associados a uma grande variedade de doenças, que incluem leucemias, linfomas, carcinomas, imunodeficiências, doenças autoimunes e doenças neuronais (ICTV, 2011). Eles englobam diversos vírus de importância para a saúde humana e animal, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV – gênero *Lentivirus*), os vírus da imunodeficiência e da leucemia felinas (FIV – gênero *Lentivirus*; e FeLV – gênero *Gammaretrovirus*), os vírus T-linfotrópicos de humanos (HTLV – gênero *Deltaretrovirus*), o vírus da leucose aviária (ALV – gênero *Alpharetrovirus*), o vírus da anemia infecciosa equina (EIAV – gênero *Lentivirus*) e o vírus da leucose bovina (BLV – gênero *Deltaretrovirus*) (ICTV, 2011).

Os retrovírus têm a capacidade de realizar transcrição reversa do seu RNA viral e se integrar no genoma da célula infectada como provírus devido à enzima transcriptase reversa. Os provírus endógenos que resultaram da infecção de células germinativas são herdados pela progênie como genes mendelianos (ICTV, 2011). Isso ocorre amplamente entre vertebrados e eles podem constituir até 10% do DNA genômico de um indivíduo, mas grande parte sofreu inativação por mutações e perdeu a capacidade de produzir vírus infecciosos (ICTV, 2011). Além da transmissão vertical pelos provírus herdados, a transmissão horizontal ocorre através de muitas rotas, incluindo sangue, saliva, leite, contato sexual, rotas perinatais ou infecção direta do embrião em desenvolvimento (ICTV, 2011).

O BLV é um deltaretrovírus conhecido por ser agente etiológico da leucose enzoótica bovina, uma infecção predominantemente assintomática, mas que, nos casos mais graves, pode cursar com o desenvolvimento de linfomas de linfócitos B em diversos tecidos e órgãos do animal (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018). Além dos bovinos, o BLV pode infectar outras espécies animais, de forma natural ou experimental. Ao longo das últimas décadas, acumularam-se evidências de que o vírus pode ser infeccioso para humanos, abrindo a possibilidade de ser relevante para a saúde pública.

Em virtude da sua capacidade de infectar células da glândula mamária de vacas e da sua característica de levar à transformação maligna dos linfócitos B e originar neoplasias, tem sido pesquisada a presença do BLV em tecido mamário humano e sua possível participação no desenvolvimento do câncer de mama em mulheres. Isso é imprescindível para melhor compreender a etiologia multifatorial da doença e o papel de um vírus de bovinos como

possível iniciador da transformação celular, além da tentativa de identificar potenciais rotas de infecção em humanos para desenvolver estratégias de controle e prevenção. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão da literatura sobre a infecção de humanos pelo BLV e sua possível relação com o desenvolvimento de câncer de mama em mulheres, compilando informações-chave sobre o assunto a fim de destacar um tema muito atual e relevante, além de aumentar a acessibilidade de tais informações e servir como material de consulta à comunidade acadêmica.

2 VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA

A seguir, nas seções do presente capítulo, é feita uma revisão bibliográfica sobre os aspectos importantes do BLV. Isso auxiliará na compreensão do agente em si e do seu possível envolvimento com patologias em humanos.

2.1 Biologia e Classificação

A família *Retroviridae* pertence à ordem *Ortervirales* e é dividida nas duas subfamílias *Orthoretrovirinae* e *Spumaretrovirinae*, que compreendem 11 gêneros e 68 espécies (Figura 1). Os retrovírus são esféricos, envelopados e possuem entre 80 e 100 nanômetros de diâmetro (ICTV, 2011).

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

– Family: <i>Retroviridae</i>	2 subfamilies
– Subfamily: <i>Orthoretrovirinae</i>	6 genera
+ Genus: <i>Alpharetrovirus</i>	9 species
+ Genus: <i>Betaretrovirus</i>	5 species
+ Genus: <i>Deltaretrovirus</i>	4 species
+ Genus: <i>Epsilonretrovirus</i>	3 species
+ Genus: <i>Gammaretrovirus</i>	18 species
+ Genus: <i>Lentivirus</i>	10 species
– Subfamily: <i>Spumaretrovirinae</i>	5 genera
+ Genus: <i>Bovispumavirus</i>	1 species
+ Genus: <i>Equispumavirus</i>	1 species
+ Genus: <i>Felispumavirus</i>	1 species
+ Genus: <i>Prosimiispumavirus</i>	1 species
+ Genus: <i>Simiispumavirus</i>	15 species

Fonte: Adaptado de ICTV (2019).

O vírus da leucose bovina (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) (Figura 2). As três espécies de PTLV englobam os vírus T-linfotrópicos de humanos (HTLV-1, 2 e 3), assim

denominados quando encontrados em humanos, e os vírus T-linfotrópicos de símios (STLV-1, 2 e 3), assim denominados quando encontrados em primatas não humanos (WOLFE *et al.*, 2005).

Figura 2 – Espécies virais do gênero *Deltaretrovirus*

— Genus: <i>Deltaretrovirus</i>
Species: <i>Bovine leukemia virus</i>
Species: <i>Primate T-lymphotropic virus 1</i>
Species: <i>Primate T-lymphotropic virus 2</i>
Species: <i>Primate T-lymphotropic virus 3</i>

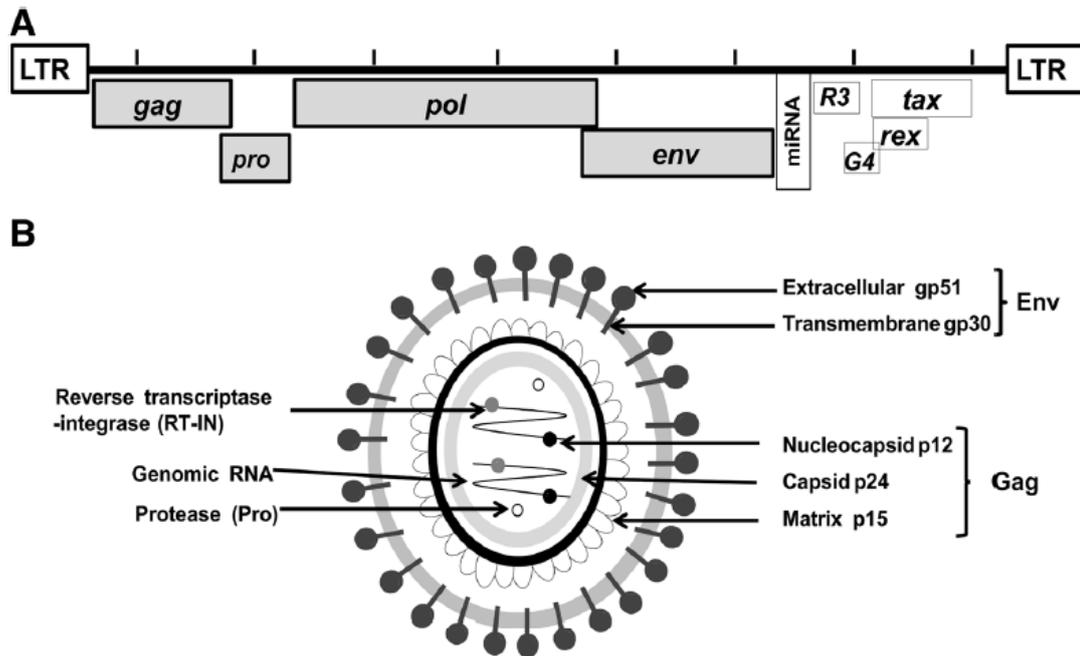
Fonte: ICTV (2019).

Atualmente, não existem deltaretrovírus endógenos reconhecidos (ICTV, 2011). No entanto, artigos recentes têm relatado a descoberta de possíveis vírus endógenos do gênero em morcegos (FARKAŠOVÁ *et al.*, 2017; HRON *et al.*, 2018) e outras espécies de mamíferos (HRON; ELLEDER; GIFFORD, 2019). As infecções apresentam uma latência longa e estão associadas a células do sistema imune, principalmente linfócitos B e T, resultando em leucemias, linfomas ou doenças neurológicas (ICTV, 2011).

2.2 Genoma e Proteínas Virais

O genoma dos deltaretrovírus 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 tRNA perto da extremidade 5' que funciona como *primer* 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 longas terminais (LTRs), formadas por três partes consecutivas denominadas U3, R e U5 (Figura 3). 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 3 – Organização genômica e estrutura da partícula viral do BLV



Fonte: Polat; Takeshima; Aida (2017).

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 e o principal alvo da resposta imune do hospedeiro (YOSHINAKA *et al.*, 1986 *apud* SCHWARTZ; LÉVY, 1994). O gene *pro* codifica a protease viral, responsável por clivar os precursores *gag*, *pro*, *pol* e *env* e originar as proteínas maduras (KATOH *et al.*, 1989 *apud* 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, de RNAase H na porção C-terminal e de integrase (IN) (BURNY *et al.*, 1980 *apud* 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 (VONÈCHE *et al.*, 1992 *apud* SCHWARTZ; LÉVY, 1994).

Um mRNA com dois *splicings* codifica as duas proteínas regulatórias Tax e Rex, e dois outros mRNAs codificam as duas proteínas acessórias R3 e G4 (SCHWARTZ; LÉVY, 1994). A Tax tem a função de estimular o início da transcrição a partir da região U3 da LTR 5'. A U3 possui três elementos de 21 pares de base responsivos à transativação da Tax. Eles contêm um núcleo de oito pares de base (AGACGTCA, TGACGGCCA ou TGACCTCA) homólogo ao elemento responsivo ao AMP cíclico (CRE). A Tax não se liga diretamente ao DNA, o que implica que fatores celulares nucleares são necessários para mediar a transativação. Ela forma um complexo com o fator nuclear CRE-binding-protein-2 (CREB2) e com o fator de ativação da transcrição 2 (ATF-2), aumentando a afinidade deles pelo CRE da região U3 (WILLEMS *et al.*, 1992 *apud* SCHWARTZ; LÉVY, 1994). Uma mutação que transforma o núcleo homólogo ao CRE do genoma do BLV na sequência consenso do CRE (TGACGTCA) aumenta a eficiência do promotor, mas prejudica a replicação viral, o que sugere um mecanismo que reduz a transcrição basal e facilita a fuga do sistema imune (MEREZAK *et al.*, 2001 *apud* BAREZ *et al.*, 2015).

A Rex é responsável pela regulação da expressão viral através do controle pós-transcrição. Ela é responsável pelo transporte de mRNAs sem ou com apenas um splicing do núcleo para o citoplasma, favorecendo seu acúmulo e seu processamento e, portanto, regulando a síntese das proteínas estruturais. Na ausência da Rex, apenas mRNAs com dois splicings são sintetizados (DERSE, 1988 *apud* SCHWARTZ; LÉVY, 1994). A R3 inibe e a G4 potencializa a função da Rex. As duas são dispensáveis para a patogênese, mas contribuem para a manutenção de altas cargas virais, a eficiência da replicação e a duração e latência da doença (FLORINS *et al.*, 2007 *apud* BAREZ *et al.*, 2015).

Os micro-RNAs virais, codificados pela RNA polimerase-III, são fortemente expressos em células malignas e pré-leucêmicas e podem ter papel no início e na progressão dos tumores (ROSEWICK *et al.*, 2013 *apud* POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Eles interagem com proteínas importantes no processo de silenciamento de RNA e mimetizam componentes celulares (BAREZ *et al.*, 2015).

2.3 Replicação Viral

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

plasmática. A replicação começa com a transcrição reversa do RNA do vírion em cDNA, usando o tRNA como *primer* para síntese de uma fita de cDNA de sentido negativo. Isso envolve a concomitante digestão do RNA viral devido à atividade de RNase H da RT. Um produto dessa hidrólise serve como primer para síntese da fita de cDNA de sentido positivo a partir da cópia de sentido negativo. Na sua forma final, a molécula de DNA fita dupla derivada da molécula de RNA fita simples contém, nas duas pontas, as LTRs formadas por sequências das extremidades 3' (U3) e 5' (U5) do RNA viral que flanqueiam uma sequência repetida (R). O DNA retroviral se integra no DNA cromossomal do hospedeiro por um mecanismo envolvendo a IN, formando um provírus. Ele pode se integrar em muitos locais do genoma celular, porém, uma vez integrado, a sequência é aparentemente incapaz de realizar transposição dentro da mesma célula. O provírus integrado é transcrito pela RNA polimerase II da célula infectada mediante o papel da Tax e os sinais transcrpcionais 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 e a instauração da latência viral (GILLET *et al.*, 2013). Conseqüentemente, 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 *apud* BUEHRING *et al.*, 2015), e linfócitos expressando antígenos virais tem vida encurtada (BAREZ *et al.*, 2015). Ou seja, a infecção pelo BLV é raramente replicativa *in vivo*, sendo que vírions não são frequentemente encontrados no sangue periférico dos bovinos (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).

2.4 Leucose Enzoótica Bovina

O BLV é o agente etiológico causador da Leucose Enzoótica Bovina. Os animais podem se infectar em qualquer idade (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018), e a infecção pode se manifestar de três maneiras nos bovinos: 1) Aleuquêmicos (AL): a maioria dos animais carrega o vírus de forma assintomática, sem alterações clínicas ou na contagem de linfócitos totais, podendo, no entanto, apresentar uma elevação na proporção de linfócitos B/T devido ao aumento no número de células B CD5+ IgM+ (PANEI *et al.*, 2013 *apud* POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017); 2) Linfocitose Persistente (LP): 30 a 70% dos animais desenvolvem uma proliferação não maligna de linfócitos B (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018), que resulta na elevação do número de linfócitos totais e é caracterizada pelo aumento estável e permanente de células B CD5+ IgM+ (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Estudos sugerem que a linfocitose persistente em bovinos é caracterizada pelo *turnover* diminuído de linfócitos B, (DEBACQ *et al.*, 2003 *apud* BAREZ *et al.*, 2015), em contraste com o aumento significativo na proliferação de células B sem redução da morte celular observado em ovelhas infectadas (DEBACQ *et al.*, 2002 *apud* BAREZ *et al.*, 2015); 3) Linfossarcoma de Células B: 0,1% a 10% dos animais infectados desenvolvem tumores (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018) de um a oito anos após a infecção, o que corresponde à forma clínica e mais grave da doença, e é geralmente vista em animais acima de dois a três anos de idade (SCHWARTZ; LÉVY, 1994).

A progressão da doença está associada a fatores genéticos como a diminuição na expressão do Fator de Necrose Tumoral alpha (TNF- α) pela célula infectada, o que é consequência de um polimorfismo na região promotora do gene (KONNAI *et al.*, 2006), e a presença do gene BoLa (JULIARENA *et al.*, 2016). Os tumores se originam do acúmulo mono ou oligoclonal de linfócitos B CD5+ IgM+, e podem afetar um ou mais linfonodos superficiais ou profundos, resultando numa linfadenomegalia considerável, além de induzir ruptura do baço (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Células neoplásicas também podem se infiltrar em outros locais como abomaso, coração, intestino, rins, pulmão, fígado, útero (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018) e glândula mamária (BUEHRING; KRAMME; SCHULTZ, 1994), o que faz com que os sinais clínicos sejam dependentes do(s) local(ais) de desenvolvimento dos tumores.

Os animais infectados clinicamente normais podem exibir certo grau de desregulação imunológica que leva a perdas econômicas por diversos motivos (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017), como aumento na incidência de doenças infecciosas (SANDEV *et al.*, 2004

apud POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017), diminuição na produção de leite (2,7% de redução em comparação a animais negativos) (OTT *et al.*, 2003 *apud* VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018), imunidade protetora reduzida após vacinação (FRIE *et al.*, 2016 *apud* VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018) e ineficiência reprodutiva (taxa de concepção 7% menor) (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018). Ainda que as alterações causadas pelo BLV estejam majoritariamente relacionadas com os linfócitos B, principalmente CD5+ IgM+, o vírus pode infectar outras populações celulares do sistema imune, como linfócitos T CD2+, CD3+, CD4+, CD8+, e γ/δ , monócitos e granulócitos no sangue periférico e nos tecidos linfóides (SCHWARTZ *et al.*, 1994), além de células epiteliais mamárias (BUEHRING; KRAMME; SCHULTZ, 1994) e células endoteliais (NAGY, 2014).

A viremia é detectável apenas durante as primeiras duas semanas de infecção (PORTETELLE *et al.*, 1978 *apud* SCHWARTZ; LÉVY, 1994), e os bovinos desenvolvem resposta sorológica a proteínas do envelope e do capsídeo viral após duas a três semanas, a qual permanece detectável por toda a vida do animal (JIMBA *et al.*, 2012 *apud* VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018). Anticorpos contra as proteínas regulatórias Tax e Rex também podem ser encontrados (POWERS *et al.*, 1991 *apud* SCHWARTZ; LÉVY, 1994). Os anticorpos podem ser detectados no soro e no leite do animal (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017).

2.5 Transmissão Viral

A infecção natural pelo BLV ocorre em bovinos, búfalos, capivaras (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018) e alpacas (LEE, L. C. *et al.*, 2012). Ovelhas são extremamente sensíveis à infecção experimental e desenvolvem linfossarcomas em mais de 90% dos casos, de seis meses a sete anos após a infecção (SCHWARTZ; LÉVY, 1994). Cabras, coelhos, ratos, porcos, cães, gatos, veados, antílopes, porquinhos-da-índia, macacos-rhesus e chimpanzés também podem ser infectados experimentalmente e apresentar uma resposta humoral persistente (SCHWARTZ; LÉVY, 1994; VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018)). Galinhas infectadas no nascimento podem desenvolver leucemia e ter o genoma do BLV nas células tumorais, mas não apresentam soroconversão detectável (ALTANEROVA *et al.*, 1990 *apud* SCHWARTZ; LÉVY, 1994). Células humanas são suscetíveis à infecção *in vitro* (DIGLIO; FERRER, 1976).

A transmissão do BLV depende da transferência das células infectadas de um animal acometido para um animal não infectado, as quais estão presentes no sangue, nos tumores e em vários fluidos corporais, como fluidos nasal e bronquial, saliva, colostro, leite e sêmen (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018). A contaminação do animal ocorre majoritariamente de forma iatrogênica, através de agulhas, luvas e equipamentos cirúrgicos contaminados com sangue infectado, quando os animais são manipulados sem o respeito das recomendações de higiene em procedimentos de injeção, descorna, colocação de brinco e palpação retal (BURRIDGE; THURMOND, 1981 *apud.* SCHWARTZ; LÉVY, 1994). Insetos sugadores de sangue, especialmente tabanídeos, podem transmitir o vírus mecanicamente (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018). Secreções nasais e bronquiais contendo células infectadas podem ser uma fonte de infecção, especialmente em confinamento e/ou em ambientes de superlotação, e bezerros podem se infectar dentro do útero durante a segunda metade da gestação (BURRIDGE; THURMOND, 1981 *apud.* SCHWARTZ; LÉVY, 1994). Apesar de antígenos virais e de DNA proviral serem detectados no sêmen e na saliva, a infecção natural através dessas secreções não foi claramente demonstrada (VAHLENKAMP; CHOUDHURY; KUZMAK, 2018).

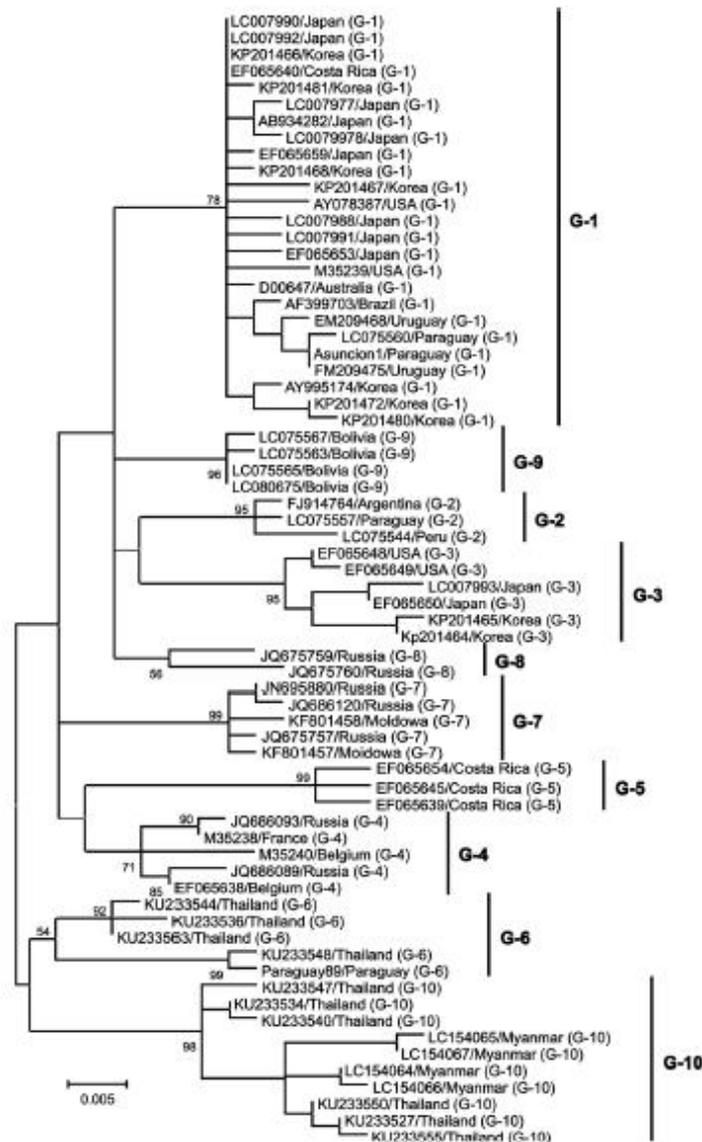
Tanto o colostro como o leite podem conter o BLV (FERRER; KENYON; GUPTA, 1981; GUTIÉRREZ *et al.*, 2015) e ser responsáveis pela infecção de animais lactentes (ROMERO; CRUZ; ROWE, 1983). No entanto, a transmissão está relacionada com a quantidade de anticorpos neutralizantes anti-BLV provenientes da mãe presente nos dois e com a efetiva imunidade passiva adquirida através da amamentação, que podem diminuir a susceptibilidade dos animais a essa rota de infecção (FERRER; PIPER, 1981). A relação entre a quantidade de vírus e a quantidade de anticorpos presentes no leite e no colostro é incerta, com estudos demonstrando ser tanto diretamente como inversamente proporcional (GUTIÉRREZ *et al.*, 2015; JAWORSKI *et al.*, 2016). No caso do sangue, já foi demonstrada que a quantidade de provírus no soro dos animais infectados está diretamente relacionada com a quantidade de provírus identificada tanto no leite como no colostro (GUTIÉRREZ *et al.*, 2015; WATANUKI *et al.*, 2019).

2.6 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 *apud* POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Atualmente, são descritos dez genótipos do BLV baseados em sequências parciais ou totais da região genômica da gp51 (Figura 4), nomeados de genótipo-1 (G1) até genótipo-10 (G10) (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Estudos mais recentes utilizaram sequências completas de cepas de BLV para realização de análises filogenéticas e observaram que elas clusterizaram em seis (-1, -2, -4, -6, -9 e -10) dos dez genótipos já estabelecidos, além de demonstrar que cada genótipo do BLV codifica substituições específicas de aminoácidos em ambas regiões estruturais e não estruturais do genoma (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017).

Figura 4 – Árvore filogenética dos 10 genótipos descritos para o BLV baseada em sequências parciais do gene *env*



Fonte: Polat; Takeshima; Aida (2017).

O G1 é o mais prevalente e é distribuído em quase todos os continentes (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). O primeiro caso de leucose enzoótica bovina foi descrito em 1871 no leste da Prússia, atualmente Klaipeda na Lituânia, e, a partir daí, o vírus foi introduzido em outros países através do comércio de animais infectados (EPAHW, 2015 *apud* POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Na Europa, cinco genótipos já foram detectados (-1, -3, -4, -7 e -8). Na Oceania, apenas o G1 foi detectado na Austrália. Na América do Norte, os genótipos-1, -3 e -4 foram detectados. Na América Central, apenas os genótipos-1 e -5 foram detectados na Costa Rica. Um grande número de genótipos foi detectado na América do Sul (-1, -2, -4, -5, -6, -7 e -9), sendo que no Brasil já foram identificados os genótipos-1, -2, -5, -6 e -7. Por fim, na Ásia, sete genótipos foram detectados (-1, -2, -3, -4, -6, -7 e -10) (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017).

2.7 Frequência Populacional do BLV

O BLV está distribuído mundialmente, tendo se espalhado por todos os continentes através do comércio animal. 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 do BLV (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Entretanto, em certos países como Itália, Portugal, Grécia e Bulgária, o vírus ainda está presente, mas a doença é ausente ou limitada a áreas específicas. Estratégias nacionais de controle e erradicação também foram impostas na Nova Zelândia e na Austrália, e ambas são livres da doença nos rebanhos leiteiros (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Nos Estados Unidos, é estimado que 84% dos rebanhos de leite e 39% dos rebanhos de corte estejam infectados (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017). Na América do Sul, a frequência do BLV é relativamente alta, e a doença ocorre em quase todos os países. No Brasil, os resultados de ensaios sorológicos pesquisando anticorpos anti-BLV variam muito entre os diferentes estados, sendo que eles foram encontrados em 56,34% dos animais de rebanhos no Paraná (DE BARROS FILHO *et al.*, 2010), em 41% na Bahia (MATOS; BIRGEL JÚNIOR; BIRGEL, 2005), em 32,1% em Pernambuco (MENDES *et al.*, 2011), e em 61,5% de propriedades no Rio Grande do Sul (FRANDOLOSO *et al.*, 2008). Na Ásia, o vírus circula nos rebanhos de diversos países, incluindo China, Japão, Coreia do Sul e Tailândia, e, no Oriente Médio, a prevalência do BLV é relativamente baixa (POLAT; TAKESHIMA; AIDA, 2017).

3 CÂNCER DE MAMA EM MULHERES

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum em mulheres no mundo, atingindo 2,1 milhões de mulheres todo ano (WHO, 2020a). Em 2018, foi estimado que 627 mil mulheres tenham morrido da doença, o que representa 15% das mortes relacionadas a câncer em mulheres no mundo (WHO, 2020a). Em 2020, é estimada que a incidência do câncer na população das Américas seja de 12,2%, a maior incidência entre todos os tipos de câncer no continente (WHO, 2020b).

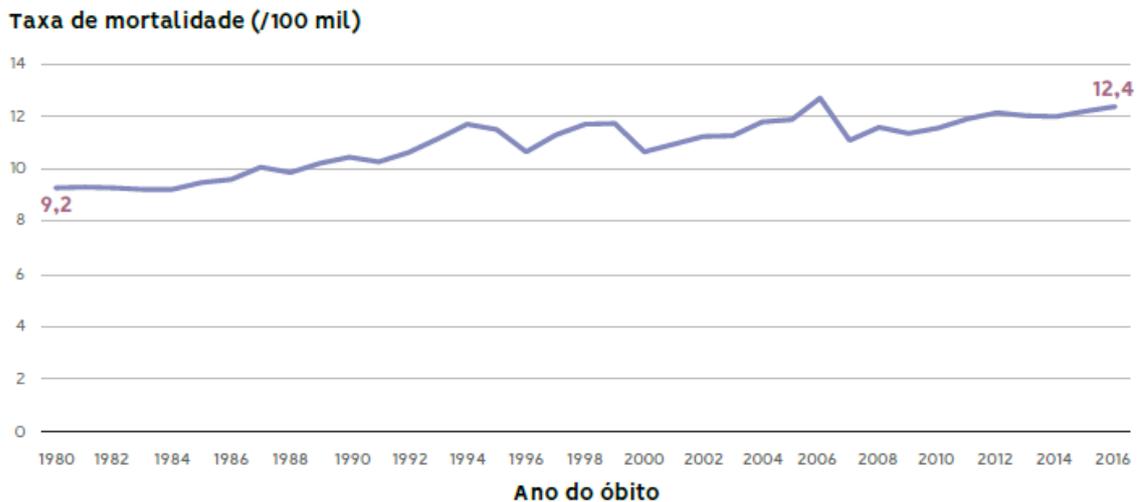
No Brasil, os óbitos por câncer de mama, notificados e confirmados, em mulheres em 2018 foram 17.572, o que representa o maior percentual de óbitos (16,4%) relacionado a câncer em mulheres. A estimativa de incidência da doença em mulheres para 2020 é de 66.280 mil casos, correspondendo a 29,7% entre todos os tipos de câncer, exceto o câncer de pele não melanoma (Figura 5) (INCA, 2020). 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 (Figura 6). Essa tendência de aumento é verificada em todas as regiões do Brasil, sendo que Sul e Sudeste apresentam os valores mais elevados (INCA, 2019).

Figura 5 – Estimativa da incidência de casos de câncer para 2020 em mulheres no Brasil

Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	66.280	29,7
Cólon e Reto	20.470	9,2
Colo do útero	16.710	7,5
Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6
Glândula Tireoide	11.950	5,4
Estômago	7.870	3,5
Ovário	6.650	3,0
Corpo do útero	6.540	2,9
Linfoma não-Hodgkin	5.450	2,4
Sistema Nervoso Central	5.230	2,3
Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma	223.110	100,0
Todas as Neoplasias	316.280	

Fonte: INCA (2020).

Figura 6 – Evolução da taxa de mortalidade de câncer de mama em mulheres no Brasil entre 1980 e 2016



Fonte: INCA (2019).

O câncer de mama pode ser classificado em tipos e subtipos. Com relação aos tipos, existem dois: *in situ*, que corresponde ao carcinoma ductal *in situ*, um precursor do câncer invasivo, e representa 16% dos cânceres de mama; e invasivo, que representa 81% dos cânceres de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Antigamente, o carcinoma lobular *in situ*, ou neoplasia lobular, também era considerado como parte do tipo *in situ*, porém sua condição benigna, apesar de associada a um maior fator de risco para desenvolvimento de câncer de mama, não apresenta potencial de progressão para um tipo invasivo, por isso ele foi excluído de alguns sistemas de estadiamento (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Com relação aos subtipos, existem os histológicos e os moleculares. Os subtipos histológicos são classificados com base no tamanho, na forma e na disposição celular do tumor, e existem, pelo menos, vinte e um, dentre os quais o carcinoma lobular infiltrante é o mais comum (15%), sendo que mais de 75% dos cânceres de mama invasivos são classificados histologicamente como “não especificados” (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). 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, tais como: a presença de receptores hormonais (HR) de estrógeno (ER) e/ou progesterona (PR); de receptores tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2); e do marcador de proliferação celular Ki67 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). 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, porém 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).

Além disso, outra análise genética importante relacionada ao câncer de mama é a avaliação de mutações nos genes *breast cancer 1* (BRCA1) e *breast cancer 2* (BRCA2), que podem levar à síndrome hereditária de câncer de mama e ovário. Eles estão envolvidos na manutenção da estabilidade do DNA e as mutações elevam em até 80% o risco de desenvolvimento de câncer de mama (EASTON; FORD; BISHOP, 1995 *apud* INCA, 2019). Somente 10%, aproximadamente, dos casos de câncer de mama pode ser atribuído às mutações nos genes BRCA 1 e 2 (APOSTOLOU; FOSTIRA, 2013 *apud* INCA, 2019). Além de variações genéticas, existem outros fatores de risco bem estabelecidos que contribuem para o desenvolvimento da doença, entre os quais estão: idade maior de 65 anos; alterações no tecido mamário, como carcinoma ductal *in situ*, carcinoma lobular *in situ*, hiperplasia atípica e aumento de densidade; níveis altos de hormônios endógenos pré ou pós-menopausa; uso recente de contraceptivos hormonais; uso recente e prolongado de terapia hormonal na menopausa; histórico pessoal de câncer de ovário ou de endométrio; um ou mais parentes em primeiro grau com câncer de mama; consumo de álcool; obesidade e sobrepeso; falta de atividade física; nunca ter engravidado ou amamentado; e idade maior de 30 anos na primeira gestação (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

4 VÍRUS E CÂNCER EM HUMANOS

O papel significativo dos vírus no câncer foi finalmente reconhecido na segunda metade do século XX, após vários vírus causadores de tumor de roedores serem descobertos (RONIT; SHOU-JIANG, 2011). Atualmente, sete vírus são classificados 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 a carcinoma nasofaríngeo; 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, associado a câncer cervical; vírus T-linfotrófico 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 pylori*, são responsáveis por mais de 90% dos cânceres infecciosos no mundo (PLUMMER *et al.*, 2016 *apud* DE MARTEL *et al.*, 2020). É estimado que 12% de todos os casos de câncer em humanos seja atribuído a vírus, com uma proporção maior em países em desenvolvimento (PARKIN, 2006 *apud* RONIT; SHOU-JIANG, 2011). Pela dificuldade de acumular evidências suficientes que estabeleçam uma associação causal entre câncer e qualquer vírus, é provável que esse percentual seja subestimado (MARTEL; FRANCESCHI, 2009 *apud* RONIT; SHOU-JIANG, 2011).

A ideia de vírus como causadores de câncer de mama foi introduzida em 1936, quando um pesquisador observou que o leite de ratas continha um fator desconhecido que causava tumores mamários nos seus filhotes quando crescidos (BITTNER, 1936). O fator desconhecido foi identificado como o vírus do tumor mamário de ratos (MMTV). Ele é um vírus da família *Retroviridae* e do gênero *Betaretrovirus* transmitido através das células germinativas e do leite da mãe para os filhotes, sendo um agente etiológico bem estabelecido para tumores de mama em ratos (LAWSON; HENG, 2010). O MMTV já foi identificado em câncer de mama em mulheres, porém seu papel no desenvolvimento da doença ainda é desconhecido (WANG *et al.*, 1995; LAWSON *et al.*, 2018). Outros vírus sabidamente causadores de câncer que já foram identificados em tumores mamários de mulheres, e podem ou não ter alguma relação com o seu aparecimento, são o HPV, o EBV e o BLV (LAWSON; HENG, 2010).

5 BLV EM HUMANOS

O BLV foi isolado pela primeira vez em 1964 (MILLER *et al.*, 1969) a partir de bovinos, e, por vários anos, estudos tentaram identificar se ele era infeccioso ou não para humanos. Nos anos 1970 e 1980, muitos experimentos foram realizados para tentar detectar anticorpos anti-BLV em soro humano, grande parte utilizando as técnicas de imunodifusão em gel de ágar (AGID) e fixação do complemento, e todos tiveram resultados inconclusivos ou negativos. Isso construiu e difundiu a opinião de que o BLV não é infeccioso para humanos e nenhuma doença humana pode ser atribuída a ele (BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003).

Hoje em dia, sabe-se que as técnicas mencionadas são muito pouco sensíveis comparadas a técnicas mais modernas, e que bovinos negativos para anticorpos anti-BLV no AGID podem ser positivos em outros ensaios, como *immunoblotting* (GROVER; GUILLEMAIN, 1992 *apud* BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003) e ELISA (HAVE; HOFF-JØRGENSEN, 1991 *apud* BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003). A partir dos anos 2000, diversos estudos tiveram êxito em identificar a exposição dos humanos ao vírus, seja através da detecção de anticorpos séricos anti-BLV ou de DNA e proteínas virais em células e tecidos humanos. Na Tabela 1, é apresentado um resumo de alguns dos resultados obtidos, sobre os quais discorrem as próximas sessões. Tais experimentos tentaram demonstrar apenas contato com o vírus, sem implicar seu envolvimento em nenhuma doença. As tentativas de relacionar a presença do BLV com alguma patologia, especialmente o câncer de mama em mulheres, serão apresentadas na sequência deste documento.

Tabela 1 – Experimentos realizados para detecção de anticorpos anti-BLV, DNA ou proteínas virais em amostras humanas

Ano	País	Número de Amostras	Alvo e Tipo de Amostra	Técnica	Resultado Positivo	Referência
2003	Estados Unidos	275	Anticorpos anti-p24 no soro	<i>Immunoblotting</i>	191	BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003
			Anticorpos anti-gp51 no soro	AGID	0	
2013	Colômbia	106	Gene <i>gag</i> no tecido mamário	PCR	43	GIOVANNA <i>et al.</i> , 2013
2014	Estados Unidos	219	Gene Tax no tecido mamário	<i>Nested in situ</i> PCR	97	BUEHRING <i>et al.</i> , 2014
		215	Antígeno p24 no	Imunohistoquímica	12	

			tecido mamário			
2019	Brasil	1500	Anticorpos anti-gp51 no soro	ELISA (kit comercial)	2/1500	SCHWINGEL <i>et al.</i> , 2019
2019	Estados Unidos	95	Genes LTR, Tax, gag e env nos leucócitos sanguíneos Anticorpos anti-p24 no soro	Nested PCR ELISA indireto	36 30 (IgG) 55 (IgM) 30 (IgA)	BUEHRING <i>et al.</i> , 2019
2019	Irã	200	Genes Tax e gag no tecido mamário	Nested PCR	60 (Tax) 16 (gag)	KHALILIAN; HOSSEINI; MADADGAR, 2019

Fonte: O próprio autor (2020).

5.1 Detecção de Anticorpos Séricos Anti-BLV

Em 2003, um estudo da pesquisadora e doutora estadunidense Gertrude C. Buehring e colaboradores utilizou a técnica de *immunoblotting* para testar 275 soros humanos para quatro isotipos de anticorpos (IgG_{1,2,3}, IgA, IgM e IgG₄) contra o antígeno p24 do BLV e obteve 191 positivos (74,3%). Entre os quatro isotipos identificados, o mais frequente foi IgG₄ (40,9%) e o menos frequente foi IgM (31,1%). A amostragem utilizada, constituída de indivíduos adultos, foi de conveniência sem a intenção de ser representativa da população geral, e os resultados do *immunoblotting* foram comparados com os resultados de AGID realizado nas mesmas amostras. Nenhum soro humano testado foi positivo para anticorpos anti-BLV na técnica de AGID, enquanto alguns soros bovinos utilizados como controle foram. O estudo discute que isso se deve, possivelmente, ao fato de o AGID utilizar como antígeno a glicoproteína do envelope gp51, enquanto o *immunoblotting* utiliza a proteína do capsídeo p24, e talvez a resposta humana à gp51 não seja tão intensa quanto a resposta dos bovinos, por isso não teriam um título de anticorpos suficientemente alto para ser detectado pela primeira técnica (BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003).

Em 2019, um estudo feito no sul do Brasil (SCHWINGEL *et al.*, 2019) teve como um de seus objetivos identificar se anticorpos anti-BLV circulavam em doadores de sangue saudáveis na região. Um total de 1500 soros provenientes de um banco de doação de sangue foram analisados para a presença de anticorpos anti-gp51 através de um kit comercial de ELISA comumente utilizado para amostras bovinas, porém não espécie-específico. Apenas dois soros foram considerados positivos, o que pode ser devido a alguns fatores: a gp51 está sujeita a variações entre as cepas virais, ou seja, o epítipo alvo do kit de ELISA utilizado

pode não estar presente no BLV circulante na região e, portanto, os soros analisados não continham anticorpos específicos para ele; e os epítomos da gp51 reconhecidos pelo sistema imune dos humanos podem ser diferentes dos reconhecidos pelo sistema imune dos bovinos.

No mesmo ano, foi publicado outro estudo de Buehring *et al.* (2019) no qual o plasma de 95 mulheres foi utilizado para a realização de ELISA indireto para identificação de três isotipos (IgG, IgM e IgA) de anticorpos anti-p24. As frequências de plasmas positivos foram: IgG = 30/95 (32%), IgM= 55/95 (58%) e IgA = 30/95 (32%). Os resultados do ELISA foram consistentes com o estudo anterior que utilizou *immunoblotting*. É sabido que a transcrição do genoma do BLV é responsiva a hormônios (em fases reprodutivas em que os hormônios estão mais elevados, teria maior expressão dos antígenos virais, portanto, maior resposta imunológica), mas no estudo não foi possível relacionar a presença de anticorpos com a fase reprodutiva em que as pacientes se encontravam na época da coleta de sangue, pois eles não tiveram acesso a esse dado. Segundo o artigo, no caso do BLV, existem desvantagens em depender apenas da detecção de anticorpos para provar infecção, visto que a proteína p24 pode não ser expressa (BUEHRING *et al.*, 2019). Linfócitos contendo o provírus não produzem vírions ou expressam os antígenos do BLV frequentemente (BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003).

5.2 Detecção do BLV no Tecido Mamário

O estudo de Buehring e colaboradores (2003) foi a primeira detecção bem sucedida e confiável de anticorpos anti-BLV em humanos e foi o ponto de partida para pesquisas subsequentes sobre o possível caráter zoonótico do BLV. Ele confirma a exposição humana ao vírus e a produção de uma resposta imune, mas não prova que houve infecção, visto que o contato pode ter sido com partículas não infecciosas em produtos de origem bovina (carne, leite e derivados). Sendo assim, muitos estudos surgiram depois com o objetivo de identificar a presença do DNA do BLV em humanos e confirmar infecção. Levando em consideração a habilidade do BLV de infectar a glândula mamária de vacas (BUEHRING; KRAMME; SCHULTZ, 1994), além de resultados de estudos que demonstram a infecção do tecido mamário humano por um retrovírus oncogênico de ratos, o MMTV (WANG *et al.*, 1995), a maioria dos trabalhos pesquisou o BLV em amostras de tecido de mama de mulheres.

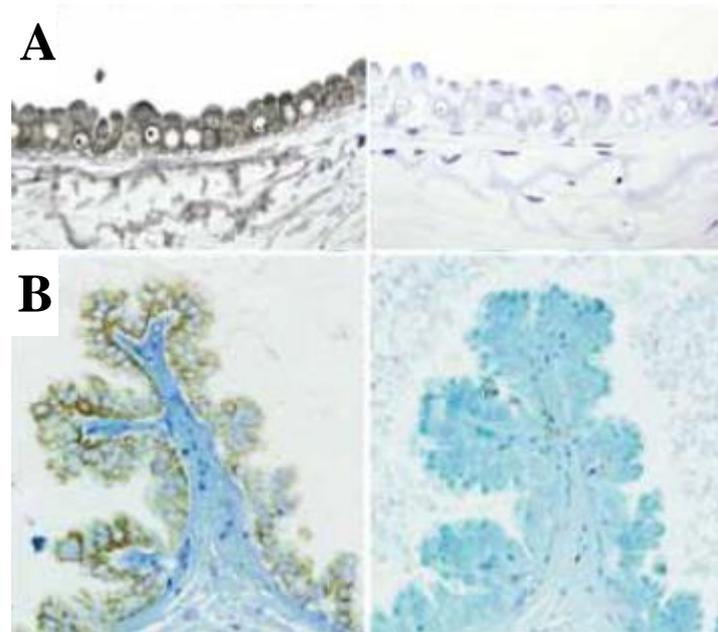
Em 2013, um estudo na Colômbia (GIOVANNA *et al.*, 2013) foi feito em continuidade a outro trabalho realizado pelo mesmo grupo de pesquisa anos antes demonstrando a presença da proteína gp51 do BLV em tecido de câncer mamário (OCHOA-

CRUZ; URIBE; GUTIERREZ, 2006 *apud* GIOVANNA *et al.*, 2013). Os pesquisadores utilizaram a técnica de PCR convencional para amplificar um fragmento do gene viral *gag*, caracterizado pelos autores como muito conservado e útil em termos de sensibilidade e especificidade para o tipo de estudo feito, em 106 amostras de tecido mamário humano com diagnóstico confirmado ou presuntivo (53) e sem diagnóstico (53) de câncer de mama. Do total, 43 amostras (40,5%) foram consideradas positivas, sendo 19 com câncer e 24 sem câncer. O sequenciamento de 26 amostras positivas e a construção de uma árvore filogenética revelou relação próxima das sequências encontradas com sequências isoladas a partir de bovinos.

Em 2014, Buehring *et al.* realizaram um estudo para investigar a infecção do vírus em tecidos humanos. Os autores ressaltam que utilizaram tecido mamário porque, nos bovinos, tanto o DNA como o antígeno p24 do BLV foram identificados na glândula mamária, ao passo que nos linfócitos só foi identificado DNA (BUEHRING; KRAMME; SCHULTZ, 1994). Foram utilizadas técnicas de *nested in situ* PCR (IS-PCR), *nested liquid-phase* PCR (L-PCR) e imunohistoquímica, e as amostras foram obtidas sem considerar idade, raça ou diagnóstico. A IS-PCR foi realizada para identificar qual tipo celular era positivo para o BLV dentro do tecido mamário e teve como alvo um segmento do gene Tax, o mais conservado do genoma viral. Das 219 amostras testadas, 97 (44%) foram positivas, e o local de amplificação foi o epitélio mamário secretório (Figura 7). Cinco amostras positivas foram submetidas à L-PCR para cinco regiões do genoma (LTR, *gag*, *pol*, *env* e Tax), a fim de melhor analisar a sequência genética do vírus. Todas foram positivas para as regiões LTR e Tax, as duas mais conservadas, ao passo que não foi possível amplificar os segmentos dos genes *gag*, *pol* e *env* em algumas.

O estudo discute que isso é consistente com resultados reportados para ambos o BLV (GILLET *et al.*, 2007) e o HTLV-1 (KAMIHIRA *et al.*, 2005), onde foram observadas deleções dessas regiões em isolados de bovinos e de pacientes humanos com leucemia, provavelmente como um mecanismo do vírus de escapar da resposta imune. As sequências das cinco amostras tiveram alta identidade com sequências de BLV detectadas em bovinos e diferiram muito pouco da sequência referência utilizada, proveniente de um isolado de bovino. Isso é consistente com a característica dos deltaretrovírus de permanecer em latência, o que diminui a frequência de mutações e, portanto, a variabilidade nos nucleotídeos (BUEHRING *et al.*, 2014).

Figura 7 – 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, mostrando que o resultado não foi falso positivo em virtude de fatores inerentes ao tecido. **B:** à esquerda, reação positiva das células epiteliais mamárias de uma paciente à presença de anticorpos monoclonais anti-p24 do BLV na imunohistoquímica, indicada pela cor marrom escura; à direita, ausência de reação na mesma amostra devido à ausência dos anticorpos primários no teste, mostrando que o resultado não foi falso positivo em virtude de fatores inerentes ao tecido.

Fonte: Adaptado de Buehring *et al.* (2014).

Também foi realizada imunohistoquímica para o antígeno p24 do BLV em 215 tecidos mamário, a fim de identificar expressão de proteínas virais (BUEHRING *et al.*, 2014). Foram utilizados anticorpos monoclonais de camundongo anti-p24, e apenas 12 amostras foram positivas (6%). A proteína foi detectada nos ductos e lóbulos do epitélio mamário secretório (Figura 7). Esse resultado também é consistente com a característica do BLV de permanecer em latência, porém sugere que a replicação viral pode ocorrer em algumas pessoas. Para garantir a confiabilidade dos resultados, todos os *primers* usados para as cinco regiões do genoma foram testados para outros retrovírus, tanto de mamíferos como de aves, e para vírus humanos exógenos e endógenos já identificados no tecido mamário, não sendo observada amplificação. Os anticorpos monoclonais anti-p24 também foram testados para reatividade

cruzada com diversos vírus encontrados em tecidos humanos, a qual não foi observada. Segundo os autores, os resultados não são surpreendentes, visto que é sabido que muitos vírus, incluindo o BLV, cruzam a barreira entre espécies naturalmente, e resta saber qual a forma de infecção para humanos, o quão frequente ela é e se está associada a alguma doença (BUEHRING *et al.*, 2014).

Em 2019, um estudo foi feito no Irã (KHALILIAN; HOSSEINI; MADADGAR, 2019) com o objetivo de determinar se mulheres do país tinham DNA do BLV presente no tecido da mama. Foram analisadas 200 amostras de tecido mamário, divididos em 172 malignos, 8 não-malignos (tecidos com adenose, papiloma ou pós-quimioterapia) e 20 não-tumorais (sem alterações). A técnica utilizada foi *nested* PCR para amplificação de fragmentos de duas regiões do genoma, Tax e gag, com *primers* desenhados pelos autores. Os resultados obtidos foram 30% (60/200) de positivos para o gene Tax e 8% (16/200) de positivos para o gene gag.

5.3 Detecção do BLV no Sangue

Baseado na predominância do BLV em leucócitos sanguíneos de bovinos infectados e sua transmissão pelo sague para outros bovinos, o estudo de Buehring *et al.* (2019) que identificou anticorpos anti-p24 no plasma de mulheres, também teve como objetivo determinar se o BLV é presente nos leucócitos sanguíneos humanos também, além do tecido mamário. A amostra foi composta pelo sangue de 95 mulheres que compareceram ao hospital por diversos motivos, os quais foram centrifugados e a camada de leucócitos e o plasma foram coletados. A camada de leucócitos foi utilizada para realização de *nested* PCR para quatro regiões do genoma do BLV (LTR, Tax, gag e env), e 36 amostras (38%) foram positivas para pelo menos uma delas. A região LTR teve o maior número de positivos (22/95), seguida pela Tax (21/95) e, por último, a gag (12/95), sendo que os dados da região env não foram divulgados.

As amostras positivas para a LTR foram sequenciadas pelo fato de ser uma região bem conservada, mas ter o maior grau de variação entre as duas regiões mais conservadas, LTR e Tax, e por ter tido maior número de positivos. As sequências resultantes foram iguais ou muito similares à sequência referência utilizada, proveniente de um bovino. Os resultados condizem com os estudos anteriores que identificaram BLV em tecido mamário humano, e sugerem que leucócitos e/ou plaquetas são também passíveis de infecção. O estudo levanta a possibilidade de o BLV estar envolvido em outros tipos de câncer, corroborando com resultados que identificaram o BLV em câncer de pulmão humano, visto que células

contaminadas podem circular pelo corpo e atingir outros órgãos e transmitir o vírus (BUEHRING *et al.*, 2019).

Também em 2019, o estudo iraniano (KHALILIAN; HOSSEINI; MADADGAR, 2019) que identificou o BLV em mulheres do país, além de testar tecidos mamários para a presença do DNA viral, objetivou determinar se ele estava presente no sangue. Foram analisadas 200 amostras de sangue de mulheres pela mesma técnica de *nested* PCR utilizada nas amostras mamárias, e o DNA viral foi detectado em 33 deles (16,5%), sendo que os resultados para cada uma das duas regiões analisadas não foram divulgados.

5.4 Ausência de Detecção do BLV

Em 2016, Zhang *et al.* publicou os resultados de experimentos realizados para identificar a presença do DNA do BLV no sangue e no tecido mamário de mulheres com câncer de mama e no sangue de mulheres sem câncer de mama na China. Foram feitas oito reações de PCR diferentes, todas anteriormente publicadas na literatura científica, e nenhuma amostra de sangue ou de tecido mamário tanto de mulheres com como sem câncer deu positiva. Também foram feitos testes para detecção de anticorpos anti-BLV nas mesmas amostras humanas com um kit comercial de ELISA, e todos foram negativos. O estudo conclui que não há evidência do BLV infectando mulheres com e sem câncer de mama na China (ZHANG *et al.*, 2016). No entanto, Buehring (2017) publicou uma resposta questionando os resultados apresentados devido a possíveis falhas nos métodos empregados. Visto que o kit comercial de ELISA utilizado é específico para bovinos, que apresentam títulos de anticorpos ao BLV mais altos do que os humanos, e que não havia detalhamento necessário sobre o processamento das amostras e as reações de PCR realizadas para permitir uma análise precisa, a conclusão da publicação não poderia ser feita baseada na metodologia utilizada (BUEHRING, 2017).

No mesmo ano, um estudo (GILLET; WILLEMS, 2016) avaliou a presença do provírus integrado do BLV em biópsias de tumores de mama. Foram avaliadas 51 amostras de câncer de mama provenientes dos Estados Unidos, México e Vietnã através do sequenciamento completo do genoma das células tumorais, e não foram encontradas evidências da inserção do DNA viral. Anos depois, um estudo feito no Japão (SAITO *et al.*, 2020) teve como objetivo identificar o BLV em linhagens de células sanguíneas humanas e de células de câncer humanas através de PCR. Foram adquiridas de laboratórios comerciais japoneses 145 linhagens de linfoblastos de células B e 54 linhagens de células cancerígenas

provenientes de diversos tecidos. Todas foram testadas por PCR para cinco genes do BLV (LTR, Tax, gag, pol e env) com *primers* desenhados pelos autores e nenhuma foi positiva para qualquer região do genoma. O estudo discute que isso pode ser devido a: falta de sensibilidade da técnica empregada em relação a células humanas, apesar de ela ser muito sensível para identificar o BLV na linhagem FLK (*Fetal Lamb Kidney*); seleção das células sanguíneas no processo de imortalização para criação da linhagem de linfoblastos, as quais podem não ser representativas da população celular; e baixa quantidade de linhagens de células de câncer de mama e de pulmão, tipos de neoplasias nas quais o BLV já foi detectado (SAITO *et al.*, 2020).

5.5 Transmissão do BLV para Humanos

O estudo de Buehring, Philpott e Choi (2003) propõe como possíveis rotas de infecção de humanos pelo BLV: o contato com bovinos e seus produtos biológicos, mas apenas 25 dos 275 indivíduos (9,7%) que cederam amostras para o experimento tinham contato direto com bovinos ou seus produtos biológicos, e seus soros não demonstraram reatividade maior à proteína do BLV; a injeção através de vacinas ou fármacos contaminados, o que os autores consideram improvável; ou o consumo de produtos de origem animal, visto que, segundo testes realizados por eles, não houve diferença na reatividade dos soros humanos ao antígeno p24 desnaturado e não desnaturado pelo calor. Isso indica que os anticorpos encontrados nos soros humanos podem representar uma reação imune a antígenos desnaturados ingeridos em produtos bovinos cozidos ou pasteurizados (BUEHRING; PHILPOTT; CHOI, 2003).

No estudo caso-controle de 2015, Buehring *et al.* traz à tona novamente a possibilidade de transmissão do BLV para humanos através da alimentação. Apesar de a pasteurização e o cozimento eliminarem a infectividade viral (OLAYA-GALÁN *et al.*, 2017), leite cru e carne crua ou mal passada ainda são muito presentes na alimentação das pessoas em diversas partes do mundo, e o leite cru foi consumido por muito tempo antes da aplicabilidade da técnica de pasteurização ser implementada e difundida, o que daria tempo do BLV ter se estabelecido na população humana (BUEHRING *et al.*, 2015). O artigo afirma que a incidência de câncer de mama é marcadamente maior em países que consomem mais leite, apesar de estudos prospectivos não terem encontrado associação entre o consumo de leite de vaca, pasteurizado ou não, e a incidência da doença (DONG *et al.*, 2011; SELLERS *et al.*, 2008). Outras possíveis formas de contaminação seriam através do contato direto com os animais e seus produtos biológicos ou através de mulheres infectadas (BUEHRING *et al.*,

2015). Tanto o BLV (ROMERO; CRUZ; ROWE, 1983) como o HTLV-1 (LAIRMORE, 2014) podem ser transmitidos pela amamentação, o que levanta a possibilidade da transmissão do BLV ser pelo leite entre os humanos também, apesar do consumo de leite materno não ter sido associado com o desenvolvimento de câncer de mama (WISE *et al.*, 2009).

Em 2019, Buehring *et al.* reforça novamente que a explicação mais provável para a presença de anticorpos anti-BLV observada nos plasmas humanos no estudo é pelo consumo do BLV inativado em produtos de origem bovina. Em 2017, um estudo (OLAYA-GALÁN *et al.*, 2017) identificou com sucesso um segmento do gene *gag* em amostras de leite e carne crus para consumo humano através da técnica de *nested* PCR, e um estudo de 2019 (WATANUKI *et al.*, 2019) conseguiu demonstrar *in vitro* a capacidade infecciosa de células infectadas pelo BLV no leite de vacas positivas, contribuindo para a hipótese de que produtos de origem animal na alimentação humana podem ser um meio de exposição ao vírus.

Com relação à possibilidade de transmissão pelo contato físico com produtos biológicos bovinos, em especial alimentos de origem animal através de ocupações profissionais envolvidas diretamente com carne e sangue dos animais, como trabalhadores de abatedouros e frigoríficos, faltam trabalhos específicos que avaliem essa rota de infecção. Um estudo (MORTON, 1995) analisou o risco de desenvolvimento de câncer de mama entre diferentes ocupações e concluiu que mulheres que trabalham cortando e embalando carne têm maior incidência da doença, mas o autor associa o resultado provavelmente ao contato direto com o material plástico da embalagem, e não com a carne crua e seus possíveis patógenos. Em contraste, outros estudos identificaram uma menor incidência de câncer de mama em açougueiros e funcionários de abatedouros e indústrias de processamento de carne (BESSON; BANKS; BOFFETTA, 2006; JOHNSON, 2011).

6 BLV E CÂNCER DE MAMA EM MULHERES

À luz da detecção da presença do MMTV em tecido mamário maligno de mulheres (LAWSON *et al.*, 2010), podendo ou não ter relação com o desenvolvimento de câncer de mama, e levando em conta os resultados que demonstraram a infecção pelo BLV em tecido mamário humano, além de sua característica oncogênica em vacas e sua semelhança ao PTLV, um deltaretrovírus causador de câncer em humanos e primatas, muitos estudos surgiram com o objetivo de tentar estabelecer sua relação com o câncer de mama em mulheres. Seguindo a linha de pesquisa, Buehring *et al.* publicaram, em 2015, um estudo de caso-controle investigando a relação da presença do BLV com câncer de mama em mulheres. O grupo “caso” era composto por 114 amostras de tecido mamário maligno de mulheres com diagnóstico de câncer de mama, e o grupo “controle” era formado por 104 amostras de tecido mamário não maligno de mulheres sem histórico de câncer de mama. Existia ainda um terceiro grupo, chamado “pré-maligno”, com 21 amostras de tecidos mamários com alterações classificadas como pré-malignas, o que totalizou 239 amostras (BUEHRING *et al.*, 2015). As técnicas utilizadas foram a mesma IS-PCR (para detecção de DNA) e a mesma imunohistoquímica (para detecção da proteína p24) empregadas no estudo anterior (BUEHRING *et al.*, 2014).

O DNA do BLV foi detectado em 59% dos casos, 29% dos controles e 38% dos pré-malignos (Figura 8) (BUEHRING *et al.*, 2015). A presença de DNA viral foi fortemente associada com o câncer de mama, tendo uma razão de chances de 3,07 (IC 95% = 1,66 – 5,69). O estudo propõe que até 37% dos casos de câncer de mama das amostras testadas poderia ser atribuídos à exposição ao BLV. A positividade ao DNA viral foi fortemente associada à ascendência/etnia, sendo identificada em apenas 29% das mulheres com ancestralidade africana, que tiveram frequência de DNA do BLV significativamente menor, em comparação a 50% das mulheres com ancestralidade caucasiana. O estudo discute que o resultado é consistente com a menor incidência de câncer de mama reportada em mulheres com ascendência africana (BONDY; NEWMAN, 2000 *apud* BUEHRING *et al.*, 2015), porém o número de amostras de mulheres afro-americanas utilizadas foi limitado, sendo a maioria dos casos composta por mulheres brancas. A maior parte dos casos consistia de carcinoma ductal invasivo, portanto não foi possível analisar a relação entre o tipo de malignidade e a presença do BLV. A proteína p24 foi detectada em apenas 12 de 236 amostras (5%), não sendo possível avaliar se casos e controles diferiam significativamente na presença da p24 (BUEHRING *et al.*, 2015).

Em continuidade com seus trabalhos prévios, Buehring *et al.* realizou, em 2017, um estudo para investigar se o BLV também é prevalente em mulheres da Austrália, país cuja incidência de câncer de mama é alta e cuja dieta é rica em produtos de origem animal, e se a presença do BLV na mama pode preceder o aparecimento de câncer (BUEHRING *et al.*, 2017). A presença do BLV foi avaliada através da IS-PCR para a região Tax do genoma viral, e 59 dos 96 tecidos testados (61,5%) foram positivos para o vírus nas células epiteliais mamárias. As amostras foram divididas em três categorias patológicas: benigna e pré-maligna, correspondendo ao grupo controle (46), e maligna, correspondendo ao grupo caso (50). Do grupo caso, 80% das amostras foram positivas, em comparação a apenas 41,3% do grupo controle, o que representa uma razão de chances de 4,72 (IC 95% = 1,71 – 13,05) para o risco de apresentar câncer de mama se ocorrer exposição ao BLV.

Para testar se a exposição ao BLV leva ao aparecimento de câncer ao longo do tempo, foram testadas amostras pareadas do mesmo indivíduo com, pelo menos, três anos de intervalo de coleta entre elas. O objetivo era analisar se mulheres cujas amostras de tecido mamário eram positivas para BLV e não tinham alterações malignas na primeira cirurgia continuariam positivas para o vírus e estariam mais propensas a desenvolver câncer de mama no momento da segunda cirurgia, realizada de três a dez anos depois da primeira. Dos 96 tecidos mamários testados, 48 tinham uma amostra pareada retirada da mesma mulher em uma cirurgia anterior. A probabilidade de desenvolvimento de câncer de mama (ou seja, de que tecidos classificados como benignos ou pré-malignos na primeira coleta venham a se tornar malignos na segunda coleta) foi significativamente maior em mulheres cujas duas amostras eram positivas para o BLV em comparação às mulheres cujas duas amostras eram negativas ou apenas uma era positiva. De 31 amostras com diagnóstico de câncer na segunda coleta, 23 (74,2%) tinham diagnóstico benigno ou pré-maligno e infecção pelo BLV na primeira, o que representa um grande percentual de tecidos que eram não-malignos e positivos para o vírus e se tornaram malignos ao longo do tempo. O resultado é consistente com a possibilidade de o BLV ser um iniciador do processo maligno e culminar no desenvolvimento de câncer de mama após anos, e esse foi o primeiro estudo que pesquisou essa relação com mais afinco (BUEHRING *et al.*, 2017).

Em 2018, um estudo (BALTZELL *et al.*, 2018) examinou a presença do BLV e do HPV, outro vírus que pode ou não estar associado a câncer de mama e que é frequentemente encontrado em co-infecções, em amostras de tecido mamário de mulheres do Texas. Foram utilizadas 214 amostras agrupadas em três categorias: benigna (controle), maligna (casos) e pré-maligna. Elas foram submetidas à IS-PCR para a região Tax do genoma do BLV e para a

região L1 do genoma do HPV tipo 16 (HPV-16). Das 214 amostras, 73 foram positivas para o BLV (34%). Quando separado por categoria, 19,6% do grupo controle, 34% do grupo pré-maligno e 57,4% do grupo maligno foram positivos. Foi concluído que mulheres com diagnóstico de câncer de mama tinham significativamente mais chance de ter DNA do BLV, com uma razão de chances de 5,87 (IC 95% = 2,83 – 12,16) e um risco atribuído de 51,82%. Mulheres com alterações mamárias pré-malignas também apresentaram alto risco de ter o DNA do BLV, com uma razão de chances de 2,24. O HPV, por sua vez, foi encontrado em apenas 14 amostras (7%), não sendo associado com os status de malignidade ou pré-malignidade dos tecidos e com a presença ou não do BLV (BALTZELL *et al.*, 2018).

O surgimento de pesquisas sobre a possível relação do BLV com o câncer de mama feminino continuou ao redor do mundo e, em 2018 e 2019 respectivamente, estudos na Argentina e no Brasil foram feitos. Na Argentina, o estudo (LENDEZ *et al.*, 2018) teve como objetivo identificar o BLV no tecido mamário de mulheres pela primeira vez no país e determinar se existe uma relação entre a presença do vírus e os biomarcadores hormonais e de proliferação celular mais comumente mensurados em câncer de mama. Foram analisadas 85 amostras de tecido mamário maligno através das técnicas de IS-PCR, para detecção de um segmento da região Tax do BLV, e imunohistoquímica (IHQ), para determinação da presença de receptores de estrógeno (ER) e de progesterona (PR), do HER2 e do marcador de proliferação Ki67. Dezenove amostras foram positivas para o BLV (22,36%), e metade delas, aproximadamente, foi positiva para ER e/ou PR, porém, não foi encontrada associação significativa entre a presença ou ausência dos receptores hormonais e a positividade para BLV. A presença do vírus foi significativamente relacionada com a detecção do HER2 e de moderado/alto índice de proliferação Ki67. O estudo discute que isso apoia a ideia do BLV estar relacionado à iniciação da transformação maligna (BUEHRING *et al.*, 2017), visto que o vírus está presente em epitélios mamários malignos que possuem alto índice de proliferação celular.

No Brasil, o mesmo estudo que realizou a detecção de anticorpos anti-BLV em doadores de sangue (SCHWINGEL *et al.*, 2019) também teve como objetivo detectar se o DNA do vírus estava presente em tecido mamário saudável e com diferentes estágios de carcinoma em mulheres do sul do país. Foram utilizadas 72 amostras de tecido mamário saudável e 72 amostras de tecido mamário com diagnóstico de carcinoma invasivo. Foi utilizada a técnica de *nested* PCR para amplificação de um segmento do gene Tax a partir dos mesmos *primers* usados na IS-PCR para essa região (BUEHRING *et al.*, 2014), com a diferença de que, nesse caso, o DNA precisou ser extraído das amostras de tecido e a PCR foi

feita em fase líquida, e não diretamente nas células mamárias (SCHWINGEL *et al.*, 2019). O DNA do BLV foi encontrado em 30,5% das amostras de tecido maligno e em 13,9% das amostras sem alteração neoplásica, o que indica uma associação entre a presença do BLV e câncer de mama, com uma razão de chances de 2,73 (IC 95% = 1,18 – 6,29). O resultado foi similar ao descrito no estudo da Colômbia (GIOVANNA *et al.*, 2013), e os dois foram menores do que resultados reportados para os Estados Unidos (BUEHRING *et al.*, 2015) e a Austrália (BUEHRING *et al.*, 2017), o que pode ser explicado pela quantidade similar de consumo de carne bovina e de leite e derivados entre Brasil e Colômbia, que fica abaixo do consumo dos outros dois países (SCHWINGEL *et al.*, 2019). Dois tecidos positivos foram submetidos a uma segunda PCR para amplificação de parte do gene *gag* e posterior sequenciamento de nucleotídeos, o qual indicou que as sequências tinham 99% de identidade com o gene do capsídeo do BLV de bovinos. Foi feita também IHQ para identificação dos biomarcadores ER, PR, HER2 e Ki-67 nas células tumorais, mas não foi possível correlacionar a presença do BLV com nenhuma das características tumorais avaliadas, provavelmente em virtude do número limitado de amostras.

Na Tabela 2, constam os experimentos mencionados que tentam relacionar a presença do BLV com o diagnóstico de câncer de mama em mulheres.

Tabela 2 – Experimentos que tentam relacionar a presença do DNA do BLV em tecido mamário de mulheres com o diagnóstico de câncer de mama

Ano	País	Número de Amostras	Alvo e Tipo de Amostra	Técnica	Resultado Positivo (%)	Razão de Chances	Referência
2015	Estados Unidos	<u>239</u> Casos: 114 Controles: 104 Pré-malignos: 21	Gene Tax no tecido mamário	<i>Nested in situ</i> PCR	Casos: 59% Controles: 29% Pré-malignos: 39%	3,07 (IC 95% = 1,66 – 5,69)	BUEHRING <i>et al.</i> , 2015
		<u>236</u>	Antígeno p24 no tecido mamário	Imunohistoquímica	5%	-	
2017	Austrália	<u>96</u> Casos: 50 Controles: 46	Gene Tax no tecido mamário	<i>Nested in situ</i> PCR	Casos: 80% Controles: 41,3%	4,72 (IC 95% = 1,71 – 13,05)	BUEHRING <i>et al.</i> , 2017
2018	Estados Unidos	<u>214</u> Casos: 61 Controles: 103 Pré-malignos: 52	Gene Tax no tecido mamário	<i>Nested in situ</i> PCR	Casos: 57,4% Controles: 19,6% Pré-malignos: 34%	5,87 (IC 95% = 2,83 – 12,16)	BALTZELL <i>et al.</i> , 2018
2018	Argentina	<u>85</u>	Gene Tax no	<i>Nested in situ</i> PCR	22,36%	-	LENDEZ <i>et</i>

			tecido mamário				<i>al.</i> , 2018
2019	Brasil	<u>144</u> Casos: 72 Controles: 72	Gene Tax no tecido mamário	<i>Nested</i> PCR	Casos: 30,5% Controles: 13,9%	2,73 (IC 95% = 1,18 – 6,29)	SCHWINGEL <i>et al.</i> , 2019

Fonte: O próprio autor (2020).

6.1 BLV e Outros Tipos de Câncer

Além do câncer de mama, estudos tentaram identificar e relacionar o BLV com outros tipos de câncer. Em 2005, LEE *et al.* tentou investigar a presença do vírus em 517 amostras de pacientes com leucemia e em 162 amostras de pacientes com câncer de pulmão, baseado em indícios de que trabalhadores de abatedouros e indústrias de processamento que estão em contato direto com carne crua tem maior risco de desenvolver leucemia (JOHNSON, 2011; JOHNSON *et al.*, 1986) e câncer de pulmão (MCLEAN; PEARCE, 2004; JOHNSON, 2011). Levando em consideração as evidências de que o BLV é um agente causador de neoplasias em bovinos e pode infectar humanos, o maior risco que os trabalhadores em contato direto com carne têm de desenvolver certos tipos de câncer poderia ser atribuído ao vírus presente nos produtos de bovinos, que infectaria os indivíduos e levaria ao aparecimento da doença. No entanto, todas as amostras foram negativas nas reações de PCR, que tinham como alvo vários segmentos do gene do envelope viral (LEE *et al.*, 2005), refutando a hipótese.

Porém, mais de dez anos depois, um experimento (ROBINSON *et al.*, 2016) testou 70 amostras de câncer de pulmão para a presença de vírus, e oito de dez amostras (80%) de carcinoma de células escamosas de pulmão deram positivas para o BLV. O estudo frisa o envolvimento dos retrovírus com neoplasias em muitas espécies, além de trazer à tona os resultados encontrados por Buehring *et al.* (2015) da alta incidência do vírus em amostras de tecido mamário maligno de mulheres e mencionar a relação estatística existente em humanos entre o desenvolvimento de câncer de mama e o subsequente desenvolvimento de câncer de pulmão (PROCHAZKA *et al.*, 2002), indicando que o agente poderia estar relacionado às duas patologias.

6.2 Transformação Celular

O mecanismo oncogênico do BLV em humanos pode se dar através da inibição do reparo no DNA celular pela Tax, o que acumularia mutações ao longo do tempo e culminaria no desenvolvimento do câncer. O papel transformante do vírus poderia ser desempenhado,

também, pela integração do provírus em regiões do genoma celular associadas à divisão da célula, o que induziria proliferação celular, ou pelo bloqueio de genes relacionados à apoptose e à supressão de tumores (GIOVANNA *et al.*, 2013).

No BLV, o gene da proteína Tax pode atuar como oncogene. Os mRNAs que codificam para a Tax podem ser detectados em animais com linfocitose persistente ou com tumores (HAAS; DIVERS; CASEY, 1992), o que sinaliza que o gene está sendo transcrito. Porém, sua expressão nem sempre é encontrada em estágios tumorais avançados (SAGATA *et al.*, 1985), indicando que ela pode ter papel no início da gênese tumoral, mas não é essencial para a manutenção do tumor (SCHWARTZ; LÉVY, 1994). Tanto a Tax do BLV como a Tax do HTLV-1 parecem afetar o controle de crescimento da célula e propiciar o acúmulo de mutações no genoma celular através da inibição do reparo do DNA pela interação com a *checkpoint kinase 2* (Chk2), uma enzima envolvida na supressão da carcinogênese (GILLET *et al.*, 2007). Ainda, a Tax e a G4 conseguem promover transformação em fibroblastos primários de embriões de ratos (BAREZ *et al.*, 2015; KERKHOFES *et al.*, 1998; WILLEMS *et al.*, 1992).

Inicialmente, na fase assintomática, a inserção do provírus privilegia regiões próximas de promotores de transcrição do genoma da célula hospedeira, causando perturbação no gene subsequente e contribuindo para o acúmulo de células infectadas e para a progressão maligna. Em células tumorais infectadas pelo BLV e pelo HTLV-1, os vírus integram regiões vizinhas a genes relacionados ao câncer e provocam perturbação (ROSEWICK *et al.*, 2017). Moléculas de DNA não integrado podem ser encontradas em animais com linfocitose persistente pré-neoplásica e servem como um marcador da progressão da doença (REYES; COCKERELL, 1996).

7 CONCLUSÃO

A leucoze enzoótica bovina é bastante negligenciada na bovinocultura pela falta de sinais clínicos e de prejuízos aparentes na produção na maioria dos casos. Entre 0,1% e 10% dos animais infectados desenvolvem a doença clínica, caracterizada pelo aparecimento de tumores malignos de linfócitos B em diversos órgãos, o que geralmente leva vários anos. Isso significa que 90% a 99,9% dos bovinos com o BLV são reservatórios e transmissores assintomáticos do vírus, sendo mantidos na produção e com seus produtos contaminados (carne, leite e derivados) chegando à mesa do consumidor.

Apesar de haverem alguns estudos em que o BLV não foi identificado em amostras humanas, existem evidências acumuladas ao longo das últimas décadas que sugerem o caráter zoonótico do vírus e sua potencial relação com casos de câncer de mama em mulheres, tornando-o relevante para a saúde pública. A detecção do agente em amostras com alterações malignas é o primeiro passo na tentativa de relacionar sua presença com o aparecimento de alguma doença, e mais de um estudo conseguiu fazer isso com sucesso. Análises de caso-controle identificaram uma relação significativa entre a presença do DNA do BLV e o câncer de mama, com uma razão de chances de até 5,87 vezes mais chances de mulheres positivas apresentarem diagnóstico da doença em relação a mulheres negativas.

A forma de transmissão do vírus para humanos, bem como seu mecanismo oncogênico no tecido mamário, ainda não estão bem estabelecidos. É especulado que o principal meio de contaminação das pessoas seja através da ingestão de produtos de origem bovina crus ou sem tratamento térmico. Isso reforça a importância do consumo de carne adequadamente cozida e de leite e derivados devidamente inspecionados e tratados termicamente, além de enfatizar a relevância da atuação do médico veterinário na garantia da sanidade dos rebanhos, no controle de alimentos de origem animal e na promoção de saúde pública. Esta revisão objetivou compilar informações-chave sobre o assunto a fim de trazer atenção para um tema atual e relevante, além de aumentar a acessibilidade de tais resultados e servir como material de consulta à comunidade acadêmica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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: 28 out. 2020.
- BALTZELL, K. A. *et al.* Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas. **Cancer**, [S. l.], v. 124, n. 7, p. 1342–1349, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cncr.31169>. Acesso em: 28 out. 2020.
- BAREZ, P. Y. *et al.* Recent advances in BLV research. **Viruses**, [S. l.], v. 7, n. 11, p. 6080–6088, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v7112929>. Acesso em: 28 out. 2020.
- BESSON, H.; BANKS, R.; BOFFETTA, P. Cancer mortality among butchers: A 24-state death certificate study. **J Occup Environ Med**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 289–293, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/01.jom.0000184867.83288.d0>. Acesso em: 28 out. 2020.
- BITTNER, J. J. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. **Science**, [S. l.], v. 84, n. 2172, p. 162, 1936. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.84.2172.162>. Acesso em: 28 out. 2020.
- BUEHRING, G. C.; KRAMME, P. M.; SCHULTZ, R. D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. **Laboratory Investigation**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 359–365, 1994.
- BUEHRING, Gertrude C. *et al.* Bovine leukemia virus discovered in human blood. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3891-9>. Acesso em: 28 out. 2020.
- BUEHRING, Gertrude C. *et al.* Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179367>. Acesso em: 28 out. 2020.
- BUEHRING, Gertrude Case *et al.* Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 5, p. 772–782, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2005.131298>. Acesso em: 28 out. 2020.
- BUEHRING, Gertrude Case *et al.* Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 1–13, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134304>. Acesso em: 28 out. 2020.
- BUEHRING, Gertrude Case. Response to “Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients”. **Breast Cancer Research**, [S. l.], v. 19, n. 24, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0808-7>. Acesso em: 28 out. 2020.
- BUEHRING, Gertrude Case; PHILPOTT, S. M.; CHOI, K. Y. Humans Have Antibodies

Reactive with Bovine Leukemia Virus. **AIDS Research and Human Retroviruses**, [S. l.], v. 19, n. 12, p. 1105–1113, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/088922203771881202>. Acesso em: 28 out. 2020.

DE BARROS FILHO, I. R. *et al.* Soroprevalência De Anticorpos Para O Vírus Da Leucose Enzoótica Em Bovinos Criados Na Região Metropolitana De Curitiba, Paraná. **Arq Inst Biol**, [S. l.], n. 1991, p. 511–515, 2010. Disponível em: <http://www.quantitativeskills.com>. Acesso em: 28 out. 2020.

DE MARTEL, C. *et al.* Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **The Lancet Global Health**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 180–190, 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7). Acesso em: 28 out. 2020.

DIGLIO, C. A.; FERRER, J. F. Induction of Syncytia by the Bovine C-type Leukemia Virus. **Cancer Research**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 1056-1067, 1976.

DONG, J. Y. *et al.* Dairy consumption and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. **Breast Cancer Res Treat**, [S. l.], v. 127, n. 1, p. 23–31, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1467-5>. Acesso em: 28 out. 2020.

FARKAŠOVÁ, H. *et al.* Discovery of an endogenous Deltaretrovirus in the genome of long-fingered bats (Chiroptera: Miniopteridae). **Proc Natl Acad Sci U S A**, [S. l.], v. 114, n. 12, p. 3145–3150, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1621224114>. Acesso em: 28 out. 2020.

FERRER, J. F.; KENYON, S. J.; GUPTA, P. Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus. **Science**, [S. l.], v. 213, n. 4511, p. 1014–1016, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.6267692>. Acesso em: 28 out. 2020.

FERRER, J. F.; PIPER, C. E. Role of Colostrum and Milk in the Natural Transmission of the Bovine Leukemia Virus. **Cancer Research**, [S. l.], v. 41, n. 12 Part 1, 1981.

FRANDOLOSO, R. *et al.* Prevalência De Leucose Enzoótica Bovina , Diarréia Viral Bovina , Rinotraqueíte Infecçiosa Bovina E Neosporose Bovina Em 26 Propriedades Leiteiras Da Região Nordeste Do Rio Grande Do Sul , Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 1102–1106, 2008.

GILLET, N. *et al.* Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, [S. l.], v. 4, p. 1–32, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>. Acesso em: 28 out. 2020.

GILLET, N. A. *et al.* Massive Depletion of Bovine Leukemia Virus Proviral Clones Located in Genomic Transcriptionally Active Sites during Primary Infection. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 9, n. 10, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003687>. Acesso em: 28 out. 2020.

GILLET, N. A.; WILLEMS, L. Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. **Retrovirology**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 75, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0308-3>. Acesso em: 28 out. 2020.

GIOVANNA, M. *et al.* Bovine Leukemia Virus Gene Segment Detected in Human Breast Tissue. **Open Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 84–90, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/ojmm.2013.31013>. Acesso em: 28 out. 2020.

GUTIÉRREZ, G. *et al.* Characterization of colostrum from dams of BLV endemic dairy herds. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 177, n. 3–4, p. 366–369, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.001>. Acesso em: 28 out. 2020.

HAAS, L.; DIVERS, T.; CASEY, J. W. Bovine leukemia virus gene expression in vivo. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 66, n. 10, p. 6223–6225, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jvi.66.10.6223-6225.1992>. Acesso em: 28 out. 2020.

HRON, T. *et al.* Remnants of an Ancient Deltaretrovirus in the Genomes of Horseshoe Bats (Rhinolophidae). **Viruses**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 185, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v10040185>. Acesso em: 28 out. 2020.

HRON, T.; ELLEDER, D.; GIFFORD, R. J. Deltaretroviruses have circulated since at least the Paleogene and infected a broad range of mammalian species. **Retrovirology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 33, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0495-9>. Acesso em: 28 out. 2020.

IARC. Biological Agents. *In*: IARC. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. France: IARC, 2012. v. 100B. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/119>. Acesso em: 28 out. 2020.

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: 28 out. 2020.

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: 28 out. 2020.

INCA. **Estatísticas de Câncer**. [S. l.]: INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 28 out. 2020.

JAWORSKI, J. P. *et al.* Short communication: Relationship between the level of bovine leukemia virus antibody and provirus in blood and milk of cows from a naturally infected herd. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 99, n. 7, p. 5629–5634, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10813>. Acesso em: 28 out. 2020.

JOHNSON, E. S. Cancer mortality in workers employed in cattle, pigs, and sheep slaughtering and processing plants. **Environment International**, [S. l.], v. 37, n. 5, p. 950–959, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.014>. Acesso em: 28 out. 2020.

JOHNSON, E. S. *et al.* Occurrence of cancer in women in the meat industry. **British Journal of Industrial Medicine**, [S. l.], v. 43, n. 9, p. 597–604, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/oem.43.9.597>. Acesso em: 28 out. 2020.

JULIARENA, M. A. *et al.* Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. **Journal of Dairy Science**, [S. l.], v. 99, n. 6, p. 4586–4589, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10480>. Acesso em: 28 out. 2020.

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**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 235–241, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.2005.00698.x>. Acesso em: 28 out. 2020.

KERKHOFS, P. *et al.* In Vitro and In Vivo Oncogenic Potential of Bovine Leukemia Virus G4 Protein. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 72, n. 3, p. 2554–2559, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jvi.72.3.2554-2559.1998>. Acesso em: 28 out. 2020.

KHALILIAN, M.; HOSSEINI, S. M.; MADADGAR, O. Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v. 135, n. January, p. 103566, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103566>. Acesso em: 28 out. 2020.

KONNAI, S. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. **Microbes and Infection**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 2163–2171, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.017>. Acesso em: 28 out. 2020.

LAIRMORE, M. D. Animal models of bovine leukemia virus and human T-lymphotrophic virus type-1: Insights in transmission and pathogenesis. **Annual Review of Animal Biosciences**, [S. l.], v. 2, p. 189–208, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022513-114117>. Acesso em: 28 out. 2020.

LAWSON, J. S. *et al.* Association of mouse mammary tumor virus with human breast cancer: Histology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction analyses. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 8, n. 141, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00141>. Acesso em: 28 out. 2020.

LAWSON, J. S. *et al.* Mouse mammary tumor virus-like sequences in human breast cancer. **Cancer Research**, [S. l.], v. 70, n. 9, p. 3576–3585, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4160>. Acesso em: 28 out. 2020.

LAWSON, J. S.; HENG, B. Viruses and breast cancer. **Cancers**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 752–772, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers2020752>. Acesso em: 28 out. 2020.

LEE, J. *et al.* Investigation of the bovine leukemia virus proviral DNA in human leukemias and lung cancers in Korea. **Journal of Korean Medical Science**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 603–606, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.3346/jkms.2005.20.4.603>. Acesso em: 28 out. 2020.

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

LENDEZ, P. A. *et al.* Bovine leukemia virus presence in breast tissue of Argentinian women. Its association with cell proliferation and prognosis markers. **Multidisciplinary Cancer Investigation**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 16–24, 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.30699/acadpub.mci.4.16>. Acesso em: 28 out. 2020.

MAEZAWA, M.; INOKUMA, H. Analysis of bovine leukemia virus integration sites in cattle under 3 years old with enzootic bovine leukosis. **Archives of Virology**, [S. l.], v. 165, n. 1, p. 179–183, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04431-6>. Acesso em: 28 out. 2020.

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. **Braz J Vet Res Anim Sci**, [S. l.], p. 171–179, 2005. Disponível em: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26428/28211>. Acesso em: 3 nov. 2020.

MCLEAN, D.; PEARCE, N. Cancer among meat industry workers. **Finnish Institute of Occupational Health**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 425–437, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.5271/sjweh.831>. Acesso em: 28 out. 2020.

MENDES, E. I. *et al.* Intercorrência Entre Leucose Enzoótica e Tuberculose em Bovinos Leiteiros do Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 1–8, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v78p0012011>. Acesso em: 3 nov. 2020.

MILLER, J. M. *et al.* Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 43, n. 6, p. 1297–1305, 1969. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/43.6.1297>. Acesso em: 28 out. 2020.

MORTON, W. E. Major differences in breast cancer risks among occupations. **J Occup Environ Med**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 328–335, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00043764-199503000-00010>. Acesso em: 28 out. 2020.

NAGY, D. W. Overview of Bovine Leukosis. **MSD Veterinary Manual**, [S. l.], 2014. Disponível em: <https://www.msdsvetmanual.com/generalized-conditions/bovine-leukosis/overview-of-bovine-leukosis>. Acesso em: 28 out. 2020.

OLAYA-GALÁN, N. N. *et al.* Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. **Epidemiology and Infection**, [S. l.], v. 145, n. 15, p. 3125–3130, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0950268817002229>. Acesso em: 28 out. 2020

POLAT, M.; TAKESHIMA, S. N.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology Journal**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–16, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0876-4>. Acesso em: 28 out. 2020

PROCHAZKA, M. *et al.* Lung cancer risks in women with previous breast cancer. **European Journal of Cancer**, [S. l.], v. 38, n. 11, p. 1520–1525, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00089-8](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00089-8). Acesso em: 28 out. 2020.

REYES, R. A.; COCKERELL, G. L. Unintegrated bovine leukemia virus DNA: association with viral expression and disease. **Journal of virology**, [S. l.], v. 70, n. 8, p. 4961–4965, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jvi.70.8.4961-4965.1996>. Acesso em: 28 out. 2020.

- ROBINSON, L. A. *et al.* Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 115, n. 4, p. 497–504, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.213>. Acesso em: 28 out. 2020
- ROMERO, C. H.; CRUZ, G. B.; ROWE, C. A. Transmission of bovine leukaemia virus in milk. **Tropical Animal Health and Production**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 215–218, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02242060>. Acesso em: 28 out. 2020.
- RONIT, S.; SHOU-JIANG, G. Viruses and Human Cancer: From Detection to Causality. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 193, n. 1, p. 118–125, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.09.011>. Acesso em: 28 out. 2020
- ROSEWICK, N. *et al.* Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms15264>. Acesso em: 28 out. 2020.
- SAGATA, N. *et al.* Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [S. l.], v. 82, n. 3, p. 677–681, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.82.3.677>. Acesso em: 28 out. 2020.
- 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**, [S. l.], v. 165, n. 1, p. 207–214, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04474-9>. Acesso em: 28 out. 2020
- SCHWARTZ, I. *et al.* In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 68, n. 7, p. 4589–4596, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jvi.68.7.4589-4596.1994>. Acesso em: 28 out. 2020
- SCHWARTZ, I.; LÉVY, D. L. Pathobiology of bovine leukemia virus. **Veterinary Research**, [S. l.], 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**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39834-7>. Acesso em: 28 out. 2020
- SELLERS, T. A. *et al.* Unpasteurized milk consumption and subsequent risk of cancer. **Cancer Causes and Control**, [S. l.], v. 19, n. 8, p. 805–811, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10552-008-9143-8>. Acesso em: 28 out. 2020.
- VAHLENKAMP T. W.; CHOUDHURY B.; KUZMAK J. Enzootic bovine leukosis. *In*: OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Terrestrial Manual)**. 8th ed. [S.l.: s.n.], 2018. cap. 3. 4. 9, p. 1113–1124. Disponível em: <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. Acesso em: 28 out. 2020.
- WANG, Y. *et al.* Detection of Mammary Tumor Virus ENV Gene-like Sequences in Human Breast Cancer. **Cancer Research**, [S. l.], v. 55, n. 22, 1995.
- WATANUKI, S. *et al.* Visualizing bovine leukemia virus (BLV)-infected cells and measuring

BLV proviral loads in the milk of BLV seropositive dams. **Veterinary Research**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 102, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0724-1>. Acesso em: 28 out. 2020.

WHO. **Breast Cancer**. Geneva: WHO, 2020a. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>. Acesso em: 28 out. 2020.

WHO. **WHO Cancer Regional Profile 2020: AMRO (Americas Region)**. Geneva: WHO, 2020b. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/country-profiles/en/>. Acesso em: 28 out. 2020.

WILLEMS, L. *et al.* Mutations in the bovine leukemia virus Tax protein can abrogate the long terminal repeat-directed transactivating activity without concomitant loss of transforming potential. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [S. l.], v. 89, n. 9, p. 3957–3961, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.89.9.3957>. Acesso em: 28 out. 2020.

WISE, L. A. *et al.* Exposure to breast milk in infancy and risk of breast cancer. **Cancer Causes and Control**, [S. l.], v. 20, n. 7, p. 1083–1090, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10552-009-9332-0>. Acesso em: 28 out. 2020.

WOLFE, N. D. *et al.* Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [S. l.], v. 102, n. 22, p. 7994–7999, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0501734102>. Acesso em: 28 out. 2020.

ZHANG, R. *et al.* Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. **Breast Cancer Research**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 16–18, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0763-8>. Acesso em: 28 out. 2020