

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

ANA PAULA MARTINS DA SILVA NOGUEIRA

**DETECÇÃO DO DNA DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB) EM TECIDOS
MAMÁRIOS HUMANOS**

**Recife
2020**

ANA PAULA MARTINS DA SILVA NOGUEIRA

**DETECÇÃO DO DNA DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB) EM TECIDOS
MAMÁRIOS HUMANOS**

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

Área de concentração: Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Dr. André Luiz Santos de Jesus

Recife

2020

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

Nogueira, Ana Paula Martins da Silva
Detecção do DNA do vírus da leucose bovina (VLB) em tecidos mamários humanos
/ Ana Paula Martins da Silva Nogueira. - 2020.

56 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas
Coorientador: Dr. André Luiz Santos de Jesus.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2020.
Inclui referências e anexos.

1. Câncer de mama. 2. Vírus animal. 3. Pesquisa em genética. I. Freitas,
Antonio Carlos de (orientador). II. Jesus, André Luiz Santos de
(coorientador). III. Título.

616.99465

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-051

ANA PAULA MARTINS DA SILVA NOGUEIRA

**DETECÇÃO DO DNA DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB) EM TECIDOS
MAMÁRIOS HUMANOS**

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

Área de concentração: Biologia Molecular

Aprovada em: 31/08/2020.

Banca Examinadora:

(Dr. Antonio Carlos de Freitas)

Universidade Federal de Pernambuco

(Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo)

Universidade Federal de Pernambuco

(Dr. Valdir de Queiroz Balbino)

Universidade Federal de Pernambuco

(Dr. Jacinto da Costa Silva Neto)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico à Deus por ter proporcionado essa etapa em minha vida, por me dar forças e saúde todos os dias para seguir em busca dos meus sonhos. À Ele seja toda honra.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me ajudado e me concedido forças durante esse período longe da minha família em outra cidade. À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela oportunidade de cursar o Mestrado em Genética (tão sonhado por mim) e ao órgão de fomento Capes pelo apoio financeiro durante todo esse tempo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas pela oportunidade e confiança a mim depositada para a realização deste trabalho e por contribuir na minha formação profissional. Bem como pela compreensão e paciência com a vinda inesperada de minha filha, isso significou muito para mim. E ao meu coorientador Dr. André Luiz Santos de Jesus por toda a ajuda concedida diariamente na execução desse trabalho no laboratório.

Aos meus pais pelo amor e apoio incondicionais, ao meu esposo Kessley Kenuel pelo companheirismo e por sempre me apoiar em minhas decisões e carreira acadêmica. À minha irmã Patrícia Martins por todo o apoio e ajuda ao cuidar da minha filha para que eu pudesse concluir a dissertação.

Aos meus colegas de laboratório por terem me auxiliado na execução da pesquisa e sanado minhas dúvidas, quando necessário. E às minhas amigas de apartamento, em especial Alanne Rayssa e Hellen Lustosa pelo companheirismo diário e pelos momentos maravilhosos compartilhados.

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete mulheres em todo o mundo. Muitos fatores de risco são conhecidos para o seu desenvolvimento, dentre eles as infecções virais. Estudos recentes têm relacionado o Vírus da Leucose Bovina (VLB) com o processo carcinogênico mamário humano. O VLB é responsável pela Leucose Enzoótica Bovina (LEB) e está disseminado mundialmente em rebanhos bovinos. Esse estudo teve como objetivo investigar, pela primeira vez, a presença do DNA do VLB em amostras mamárias de mulheres do Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. O DNA do VLB foi detectado em 73/111 (65,7%) amostras mamárias, sendo positivas para *Tax* 71/111 (63,9%), para *LTR* 2/38 (5,2%) e para *gag* 1/73 (1,3%). Dessas amostras, o DNA viral foi encontrado em 22/27 (81,4%) amostras de câncer de mama e em 34/46 (73,9%) amostras com alterações benignas (*odds ratio*: 1.67; 95% IC: 0.51-5.4; $p=0.57$). Esses resultados demonstram que o VLB está presente em tecidos mamários e em uma proporção maior nas amostras com câncer de mama, o que reforça a hipótese de que o VLB possa ter algum papel no surgimento e/ou desenvolvimento dessa neoplasia. Esses achados abrem espaço para que mais estudos sejam realizados com uma maior quantidade de amostras, a fim de contribuir para um melhor entendimento de uma possível relação causal do VLB com o câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. Vírus da Leucose Bovina. *nested* PCR.

ABSTRACT

Breast cancer is the neoplasm that most affects women worldwide, many risk factors are known for its development, including viral infections. Recent studies have linked the Bovine Leukosis Virus (VLB) with the mammary carcinogen process. VLB is responsible for Bovine Enzootic Leukosis (LEB) and is widespread worldwide in cattle herds. This study aimed to investigate for the first time the presence of VLB DNA in breast samples of women from the State of Pernambuco, Northeastern Brazil. VLB DNA was detected in 73/111 (65.7%) breast samples, being positive for *Tax* 71/111 (63.9%), for *LTR* 2/38 (5.2%) and for *gag* 1/73 (1.3%). Of these samples, viral DNA was found in 22/27 (81%) breast cancer samples and in 34/46 (73%) samples with benign changes (*odds ratio*: 1.67; 95% IC: 0.51-5.4; $p=0.57$). These results demonstrate that VLB is present in breast tissues and in a higher proportion in breast cancer samples, this reinforces the hypothesis that VLB may play some role in the emergence and / or development of this neoplasm. These findings make space for more studies to be carried out with a larger number of samples, in order to contribute to a better understanding of a possible causal relationship between VLB and breast cancer.

Key words: Breast cancer. Bovine Leukosis Virus. *nested* PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Modelo hipotético de progressão do tumor de mama.....	15
Figura 2 -	Representação esquemática da organização do genoma de retrovírus.....	19
Figura 3 -	Representação esquemática da estrutura do genoma do BLV.....	20
Figura 4 -	Visão geral de um ciclo de replicação viral hipotético.....	23
Figura 5 -	Padronização da <i>Nested PCR (LTR)</i>	36
Figura 6 -	Padronização da <i>Nested PCR (Tax)</i>	36
Figura 7 -	Padronização da <i>Nested PCR (Gag)</i>	37
Figura 8 -	Detecção do DNA de VLB em amostras de tecido mamário com o primer <i>Tax</i>	38
Figura 9 -	Detecção do DNA de VLB em amostras de tecido mamário com o primer <i>LTR</i>	39
Figura 10 -	Detecção do DNA de VLB em amostras de tecido mamário com o primer <i>gag</i>	39
Gráfico 1 -	Frequência do VLB nas amostras de câncer de mama.....	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais tipos moleculares de câncer de mama determinados pelo perfil de expressão gênica.....	16
Quadro 2 - Fatores de risco associados ao surgimento do câncer de mama.....	17
Quadro 3 - Detecção do DNA do VLB em tecidos mamários humanos.....	27
Quadro 4 - Diagnósticos histológicos das amostras analisadas.....	32
Quadro 5 - Diagnósticos histológicos das amostras positivas para o VLB.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos oligonucleotídeos e tamanhos dos fragmentos.....	33
Tabela 2 - Mudanças de temperaturas na padronização da <i>nested</i> PCR.....	35
Tabela 3 - Protocolo padronizado da reação da <i>nested</i> PCR.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

VLB	Vírus da Leucose Bovina
CIS	Carcinomas <i>in situ</i>
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EBV	Vírus Epstein-Barr
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano
ER	Receptor de estrógeno
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
HTLV	Vírus da leucemia de células T humanas
IDC	Carcinoma ductal invasivo
LCIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
LEB	Leucose bovina enzoótica
MMTV	Vírus do tumor mamário de camundongo
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
LP	Linfocitose persistente
PR	Receptor de progesterona
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
VLM	Vírus da Leucemia Murina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1	CÂNCER DE MAMA.....	14
2.2	VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB).....	18
2.2.1	Características gerais.....	18
2.2.2	Estrutura e genoma retroviral.....	19
2.2.3	Infecção e transmissão Viral.....	20
2.2.4	Patogenicidade induzida por VLB.....	23
2.3	VLB E CÂNCER DE MAMA.....	26
2.4	PREVALÊNCIA.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO ANALISADO.....	32
4.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	33
4.3	EXTRAÇÃO DO DNA.....	33
4.4	DETECÇÃO DO DNA VIRAL.....	34
5	RESULTADOS.....	35
5.1	PADRONIZAÇÃO DA <i>NESTED</i> PCR.....	35
5.2	DETECÇÃO DO DNA DO VLB EM TECIDOS MAMÁRIOS.....	37
5.3	ANÁLISE DIAGNÓSTICA DAS AMOSTRAS.....	40
6	DISCUSSÃO.....	42
7	CONCLUSÕES.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47
	ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO.....	55

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete mulheres em todo o mundo e o número de casos cresce continuamente. Essa doença é influenciada por vários fatores que atuam em sinergia, porém os fatores etiológicos que contribuem para o desenvolvimento do câncer de mama ainda não foram completamente definidos.

Dentre os fatores de risco associados ao câncer de mama pode-se citar a exposição hormonal excessiva, radiação, idade, menopausa, dentre outros. Além dos fatores de risco já conhecidos, nos últimos anos houve um interesse crescente na possível etiologia viral. Alguns vírus foram detectados em tecidos mamários e apresentaram potencial oncogênico como o Vírus do Tumor Mamário de Camundongo (MMTV), Vírus do Papiloma Humano (HPVs), Vírus Epstein-Barr (EBV - também conhecido como Vírus do Herpes Humano tipo 4) e Vírus da Leucose Bovina (VLB).

O VLB foi recentemente identificado em cânceres de mama humanos, trata-se de um vírus que está distribuído mundialmente e afeta o gado causando a Leucose Enzoótica Bovina (LEB) em uma pequena proporção dos animais infectados. E, por apresentar semelhanças com os retrovírus humanos HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e HTLV (Vírus da Leucemia de células T Humanas), presume-se que o VLB esteja envolvido no surgimento do tumor mamário humano.

Ainda não há um consenso sobre um papel viral no surgimento e/ou desenvolvimento do câncer de mama humano, no entanto, identificar o envolvimento de um vírus permitiria várias opções de prevenção. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo investigar a presença do DNA do VLB em amostras mamárias de mulheres com diagnóstico histológico de câncer de mama e com alterações benignas, oriundas do estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil.

Nos últimos anos, o DNA do VLB foi detectado no tecido mamário maligno e benigno de mulheres de diferentes populações, porém no Brasil há somente um estudo de detecção nesse tecido, realizado na região Sul do país. Estudos que relacionem a presença do VLB com o desenvolvimento de carcinomas mamários podem resultar no impacto das estratégias utilizadas para prevenção do câncer e consequente avanço terapêutico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença multifatorial que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. De acordo com a última estimativa mundial (2018), é o segundo tipo de neoplasia mais incidente (2,1 milhões de casos registrados) e a mais frequente em mulheres, corresponde a 24,2% dos casos de câncer feminino (INCA, 2020; BRAY et al., 2018). No Brasil, a estimativa para 2020-2022 aponta que ocorrerão 66.280 novos casos (INCA, 2020) e 16.927 óbitos, sendo 16.724 mulheres e 203 homens (SIM, 2017).

O câncer de mama é cerca de 100 vezes menos comum entre os homens do que entre as mulheres (American Cancer Society, 2017). É uma neoplasia influenciada por vários fatores que atuam em sinergia, os quais desencadeiam uma multiplicação desordenada de células da mama que resulta em células anormais que se multiplicam e geram um tumor (INCA, 2020).

As mamas são glândulas compostas por componentes estromais (estroma mixomatoso) e componentes epiteliais (lóbulos e ductos). Os lóbulos são as estruturas produtoras de leite formadas por terminações ductais acinares. A classificação histopatológica dos tumores mamários classifica os tumores epiteliais da mama conforme sua localização em dois grandes grupos: ductais e lobulares, entretanto derivações dos tumores ductais também são classificados em tumores especiais.

Em relação ao potencial metastático, os tumores mamários também podem ser classificados em carcinomas *in situ* (CIS), nos quais não há invasão estromal e carcinomas invasivos (American Cancer Society, 2019; Hondermarck et al., 2008). Além das características histomorfológicas, uma ampla variedade de tumores mamários tem sido descrita com base em características moleculares e ainda de acordo com o perfil de expressão gênica (Barnes et al., 2012; Bhargava et al., 2010; Poliak, 2007; Cancer 2003).

Os carcinomas *in situ* (CIS) são caracterizados por células tumorais sem degradação da membrana basal ou invasão estromal. Os CIS podem ser subdivididos genericamente em carcinoma lobular *in situ* (do inglês, *lobular carcinoma in situ*, LCIS) e carcinoma ductal *in situ* (do inglês, *ductal carcinoma in situ*, DCIS) (Hondermarck et al., 2008). Ambos apresentam o potencial de se

tornerem invasivos dentro de um período de tempo que pode variar entre alguns anos ou décadas (Barnes et al., 2012; Hondermack et al., 2008; Leonard & Swain, 2004). O DCIS é o tipo mais comum de câncer de mama não invasivo (American Cancer Society, 2019; Campa et al., 2015). Neste tipo, as células que revestem os ductos se tornam células atípicas que podem se espalhar para além do sistema ductal e progredir ou não para carcinoma invasivo (Polyak, 2007) (Figura 1).

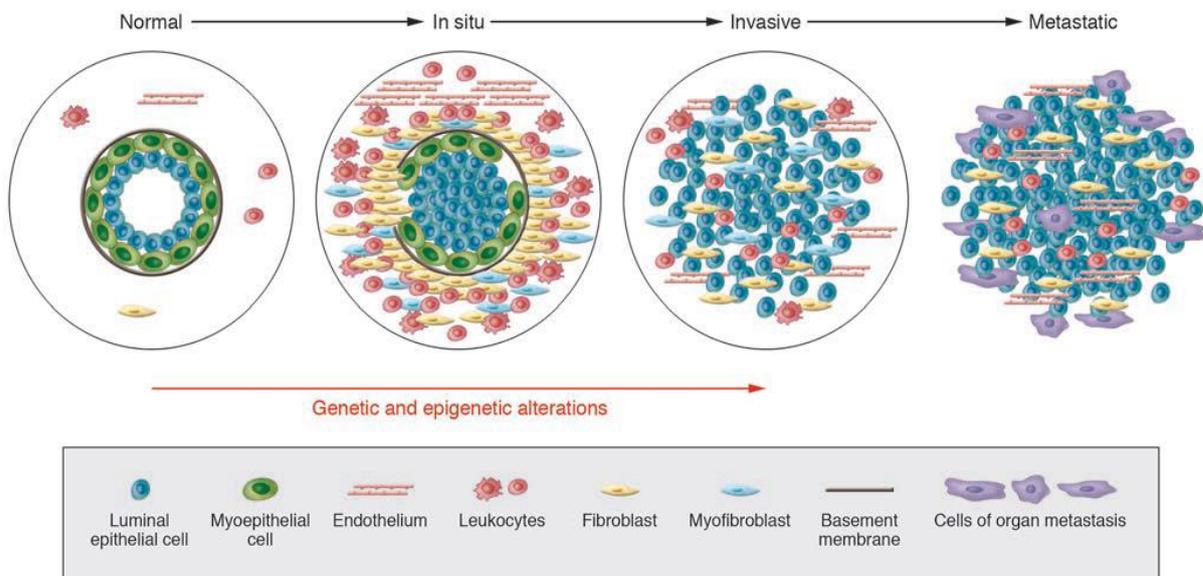


Figura 1: Modelo hipotético de progressão do tumor de mama. Visão esquemática da progressão normal, in situ, invasiva e metastática do carcinoma (Polyak, 2007).

O câncer de mama invasivo caracteriza-se pela invasão ao tecido mamário circundante, os tipos mais comuns são carcinoma ductal invasivo (CDI) e carcinoma lobular invasivo (CLI). O CDI é o tipo mais comum de câncer de mama, apresenta uma predominância de cerca de 70 – 80% de todos os casos de cânceres de mama. Ambos os tipos podem migrar do local de origem e se espalhar para outras partes do corpo através do sistema linfático e da corrente sanguínea (American Cancer Society, 2019; Cancer, 2003).

O carcinoma invasivo apresenta alguns subtipos que são menos comuns do que os tumores mencionados anteriormente, esses costumam ter o nome de características que são visualizadas ao microscópio, como as formas pelas quais as células são organizadas. Esses incluem carcinoma adenoide cístico, carcinoma adenoescamoso de baixo grau, carcinoma medular, carcinoma mucinoso, carcinoma papilar e tubular, entre outros. Há ainda tipos especiais (mais raros) de carcinoma

invasivo, como a doença de Paget, Angiossarcoma e Tumor de Phyllodes (American Cancer Society, 2019).

Os tumores de mama comumente são testados quanto à presença de receptores para os hormônios femininos estrógeno (ER) e progesterona (PR). A presença desses receptores hormonais indica que o tecido neoplásico se prolifera em resposta a esses hormônios, o que resulta em um melhor prognóstico e facilita o tratamento. Com isso, de acordo com as características moleculares (Quadro 1), o câncer de mama pode ser classificado em ER e PR, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), Ki-67 (também conhecida como MKI67), citoqueratina 5 (CK5) e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR). E com base nos perfis de expressão gênica, destacam-se os seguintes tipos moleculares: Luminal A, Luminal B, superexpressão de HER-2 e tumores basais (triplos negativos) (American Cancer Society, 2019; Bhargava et al., 2010; Hammond et al., 2010; Cheang et al., 2009/2006; Sorlie et al., 2001; Perou et al., 2000).

Quadro 1: Principais tipos moleculares de câncer de mama determinados pelo perfil de expressão gênica. Fonte: (SJ Schnitt, 2010).

	Luminal	HER2	Basal
Padrão de expressão gênica	Alta expressão de receptores hormonais e genes associados Luminal A > Luminal B	Alta Expressão de HER2 e outros genes no amplicon; Baixa expressão de ER e genes associados.	Alta expressão de genes epiteliais basais; Baixa expressão de ER e genes associados; Baixa expressão de HER2.
Características clínicas	~ 70% dos cânceres de mama invasivos; ER/PR positivos; Luminal B tende a ter um grau histológico maior do que Luminal A; Alguns superexpressam HER2 (Luminal B)	~15% dos cânceres de mama invasivos; ER/PR negativos; Mais propensos a ser de alto grau e positivos para linfonodos.	~ 15% dos cânceres de mama invasivos; A maioria dos ER/PR/HER2 negativo; Disfunção de BRCA2 (linhagem germinativa, esporádica); Comum em mulheres afro-americanas.

O câncer de mama possui numerosos fatores de risco que contribuem para sua ocorrência, porém os agentes iniciadores da transformação maligna das células ainda não são totalmente compreendidos (Lawson et al. 2018; Kamińska et al. 2015). Dentre os fatores de risco associados a essa doença estão a exposição a altos níveis de estrogênios, radiação, idade, raça, número de nascimentos e obesidade após a menopausa, entre outros (Quadro 2) (Kamińska et al., 2015).

Quadro 2: Fatores de risco associados ao surgimento do câncer de mama. Fonte: INCA, 2020.

Fatores ambientais e comportamentais	Fatores da história reprodutiva e hormonal	Fatores genéticos e hereditários
Obesidade e sobrepeso após a menopausa;	Primeira menstruação antes de 12 anos;	História familiar de câncer de ovário;
Sedentarismo e inatividade física;	Não ter tido filhos;	Casos de câncer de mama na família, principalmente antes dos 50 anos;
Consumo de bebida alcoólica;	Primeira gravidez após os 30 anos;	História familiar de câncer de mama em homens;
Exposição frequente a radiações ionizantes (Raios-X).	Menopausa após os 55 anos;	Alteração genética, especialmente nos genes BRCA1 e BRCA2.
	Uso de contraceptivos hormonais (estrogênio-progesterona);	
	Ter feito reposição hormonal pós-menopausa, principalmente por mais de cinco anos.	

Quanto à susceptibilidade familiar, sabe-se que mutações em vários genes, como *BRCA1* e *2* (genes supressores de tumor), *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*, estão

associadas ao risco aumentado de ocorrência de câncer de mama (Campeau et al, 2008; Antoniou et al. 2003). O gene *BRCA 1* está associado com aproximadamente 90% dos casos de câncer hereditário, enquanto que o *BRCA2* está mais associado com o câncer de mama masculino (Yiannakopoulou, 2014; Contractor *et al.*, 2008). Outro gene relacionado ao desenvolvimento do tumor mamário é o oncogene *HER2*, cujas mutações levam ao desenvolvimento de um tumor mais agressivo (Bianchini *et al.*, 2014; Kao *et al.*, 2006).

2.2 VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB)

2.2.1 Características gerais

O Vírus da Leucose Bovina (VLB) é um retrovírus enzoótico, exógeno e oncogênico semelhante ao vírus da leucemia de células T humanas (HTLV). O VLB é responsável pela Leucose (leucemia / linfoma) Enzoótica Bovina (LEB) de células B, condição que se desenvolve em menos de 5% do gado infectado e aproximadamente 30% desenvolvem Linfocitose Persistente (LP), uma condição caracterizada por um aumento de Linfócitos B circulantes, os animais que desenvolvem LP permanecem estáveis por um longo período. A maioria dos bovinos infectados são assintomáticos (Rodríguez et al., 2011; Gillet et al., 2007; Schwartz & Lévy, 1994).

O VLB pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Deltaretrovirus*. O nome *retro* (reverso) origina-se da enzima transcriptase reversa (DNA polimerase dependente de RNA) que está presente em todos os membros da família. Os vírus incluídos na família *Retroviridae* são HIV, HTLV e VLB, os quais compartilham homologia estrutural e funcional. A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) classificaram os vírus humanos HIV e HTLV como carcinogênicos do grupo I (IARC, 2007), sendo assim, por pertencer à mesma família que estes vírus carcinogênicos, há a possibilidade de que o VLB também possa ser carcinogênico em humanos, o que ainda está em investigação.

Em semelhança ao HTLV-I, o VLB induz infecção semelhante com ausência de viremia crônica e um longo período de latência, sendo que afeta a linhagem de células B e o HTLV-I afeta a linhagem de células T. Apesar de ambos os vírus apresentarem sequências genômicas diferentes, suas estruturas e propriedades diferem de outras classes dos retrovírus, portanto foram reclassificados em um novo

grupo de retrovírus (Gillet et al., 2007) (Figura 2). Em ambos as proteínas *Tax* e *Rex* são codificadas na região *pX*, situada entre os segmentos *env* e LTR 3'. A proteína *Tax* tem papel fundamental no potencial oncogênico do vírus, é a principal proteína envolvida na replicação viral (Sakurai et al., 1991; Willems et al., 1987).

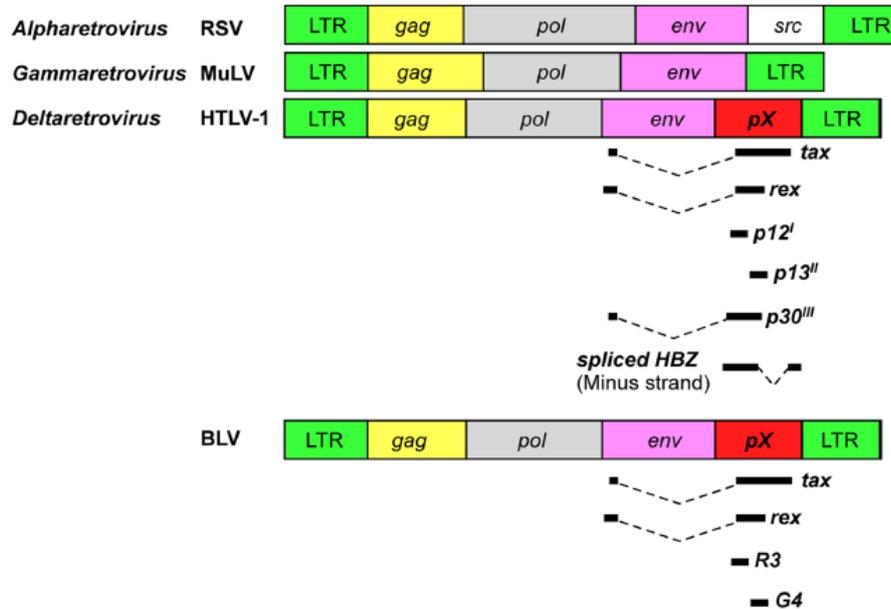


Figura 2: Representação esquemática da organização do genoma de retrovírus. vírus do sarcoma de Rous – RSV, vírus da leucemia murina – MuLV, vírus da leucemia de células T humanas – HTLV-1 e vírus da leucose bovina – BLV (Aida et al., 2013).

2.2.2 Estrutura e genoma retroviral

Assim como outros retrovírus, o VLB possui regiões genômicas típicas: *gag* (codifica as proteínas estruturais internas), *pro* (codifica a protease viral), *pol* (codifica a transcriptase reversa) e *env* (codifica as glicoproteínas do envelope), flanqueadas por duas repetições terminais longas (LTRs) nas extremidades terminais do genoma. No entanto, por ser um *deltaretrovírus* apresenta uma região adicional conhecida como *pX* que codifica as proteínas auxiliares e acessórias (*Tax*, *Rex*, *R3* e *G4*) e também expressa microRNAs reguladores (Figura 3) (Polat et al., 2017b/2016; Lee et al., 2016; Ochirkhue et al., 2016;; Rosewick et al., 2013).

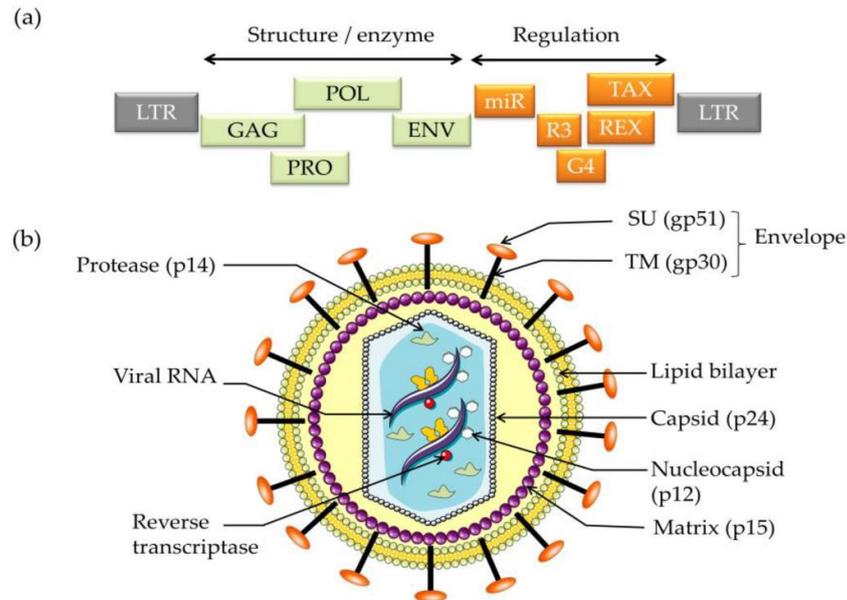


Figura 3: Representação esquemática da estrutura do genoma do BLV (a) e da partícula viral (b). A - Genes estruturais em verde-claro e os genes regulatórios da região pX destacados em laranja. B - Duas cópias de RNA fita simples, associadas às proteínas do nucleocapsídeo (p12), transcriptase reversa e integrase, dentro de um capsídeo formado pelas proteínas p24. A proteína p15 (matriz) é a responsável por interligar o capsídeo e o envelope externo, que é formado por uma bicamada lipídica, no qual, as demais proteínas virais (gp51 e gp30) ficam inseridas. (Adaptado de Barez et al. 2015).

O genoma viral consiste em duas moléculas de RNA de fita simples com polaridade positiva, com um comprimento de 8714 nucleotídeos (Sagata et al., 1985). As partículas virais variam de 60 a 125nm e também apresentam um envelope e um capsídeo icosaédrico. Atualmente, a classificação filogenética do VLB inclui 11 genótipos, relatados em diferentes regiões do mundo (Bazzucchi et al., 2019; Yu et al., 2019; Gautam et al., 2018; Polat et al., 2017b/2016; Lee et al., 2016; Ochirkhuu et al., 2016; Ababneh et al., 2012).

2.2.3 Infecção e transmissão Viral

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) foi relatada primeiramente na Europa, como uma condição clínica que se espalhava pelos rebanhos e resultava na presença de nódulos amarelados no baço aumentado de bovinos (Leisering, 1871 citado por Olson and Miller, 1987). No entanto foi nos Estados Unidos que Janice Miller e seus colegas descobriram o VLB em bovinos em 1969; a associação causal do vírus com a LEB foi demonstrada quando eles utilizaram microscopia eletrônica para observar a partícula viral dentro de um linfócito em vacas com linfossarcoma e a utilização dos postulados de Koch (Miller et al., 1969).

A introdução de animais europeus infectados em países livres da doença possivelmente provocou a disseminação do VLB. No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em 1959 no Rio Grande do Sul (Merck et al., 1959). A importação indiscriminada de bovinos do hemisfério Norte por pecuaristas das regiões Sudeste e Sul tem sido apontada como a causa da introdução do VLB nos rebanhos brasileiros (Abreu et al., 1994). Atualmente, a LEB está distribuída mundialmente e acomete principalmente os rebanhos leiteiros.

Quando o VLB foi descoberto em bovinos, houve a preocupação de que esse vírus também poderia infectar humanos e causar doenças (Miller et al., 1969). No entanto, foram feitas pesquisas sorológicas a fim de detectar anticorpos para o VLB em humanos (o gado infectado apresentava esses anticorpos no sangue), e não apresentaram resultados positivos. Com isso, acreditou-se por um tempo que o VLB não era transmissível ao homem e que não estava associado a nenhuma doença humana (NAHMS, 1969).

A capacidade de infecção do VLB em várias linhagens celulares foi demonstrada em 1976 (Graves e Ferrer, 1976). Nesse estudo, culturas celulares de humanos, símios (chimpanzés e rhesus), caninos, ovelhas, cabras e morcegos foram infectadas com amostras de vacas com LP. Em todas as culturas celulares foi observada a produção do vírus completo, com isso, os autores destacaram o potencial de risco biológico para os seres humanos.

Com o passar do tempo, houve o surgimento de técnicas modernas e mais sensíveis, como o método Immunoblotting (*Western Blotting*), o que favoreceu novos testes de soros humanos quanto à presença de anticorpos para VLB. Com essa técnica os anticorpos foram identificados no soro de 74% de 257 pessoas saudáveis (Buehring et al., 2003). No entanto, especulou-se que a presença dos anticorpos em humanos poderia ser apenas uma reação imune ao consumo de carne bovina e laticínios pasteurizados. Posteriormente, o advento da PCR e do sequenciamento de DNA tornou possível a detecção do DNA do VLB, marcador mais definitivo da presença viral.

Estudos posteriores demonstraram que o VLB infecta algumas espécies naturalmente, especialmente as que estão próximas ao gado: búfalos, ovelhas, alpacas e experimentalmente em coelhos, ratos e porcos (Lee et al., 2012; Gillet et al., 2007). Quanto aos humanos, as evidências de infecção por VLB vêm se acumulando nos últimos anos (Schwingel et al., 2019; Baltzell et al., 2018; Buehring

et al., 2017; Gillet & Willems, 2016; Zhang et al., 2016; Buehring et al., 2015; Lendez et al., 2015; Mesa et al., 2013).

Em bovinos, a infecção por VLB é caracterizada por um estágio assintomático, LP e linfoma. A maioria dos bovinos infectados é assintomática, porém um terço deles apresenta LP, uma forma benigna da doença caracterizada por um aumento de linfócitos B no sangue periférico. Esses animais geralmente permanecem estáveis por um longo tempo ou por toda a vida. E após o período de latência, por mecanismos ainda desconhecidos, 1 a 5% do rebanho infectado desenvolve leucemia/linfoma de células B, uma fase terminal da doença (Rodriguez et al., 2011; Florins et al., 2008; Schwartz & Levy, 1994).

A LEB é diagnosticada pela presença de tumores e/ou aumento geral dos linfonodos. O rebanho com LEB geralmente apresenta perda de peso corporal, diminuição do apetite e redução da produtividade. As células cancerígenas penetram muitos órgãos, como o coração, útero, glândulas mamárias e região epidérmica do sistema nervoso central (Angelos & Thurmond, 2008; Miller et al., 1969). O gado infectado com VLB pode ser identificado através de testes sorológicos para detecção de anticorpos, geralmente o vírus permanece inativo nas vacas infectadas até serem expostas a uma situação de estresse como durante climas extremos, parto ou doença (Valii, 2007).

A transmissão em bovinos ocorre principalmente de forma horizontal ou iatrogênica, envolve o contato direto com as células infectadas presentes no sangue ou leite, bem como as práticas veterinárias inadequadas com o uso de instrumentos contaminados sem a devida esterilização (Hopkins & DiGiacomo, 1997; Johnson et al., 1985). A transmissão vertical é menos comum, mas pode ocorrer através da placenta ou após o nascimento, por meio dos linfócitos infectados presentes nos fluidos corporais e pelo aleitamento materno dos bezerros (Hopkins & DiGiacomo, 1997; Lassauzet et al., 1991). Além disso, há evidências de transmissão através de insetos hematófagos (Ooshiro et al., 2013).

Em humanos, ainda não se sabe a via exata de transmissão do VLB, a mais provável seria zoonótica, como uma infecção transmitida por alimentos. A suposição é de que o leite não pasteurizado e a carne crua possa ser uma maneira pela qual o vírus entra no corpo, apesar de que o VLB é inativado pelo processo de pasteurização e cozimento. No entanto, foi demonstrado que os vírus presentes nos produtos comercializados de bovinos podem não ser completamente inativados por

esses processos (Kale et al., 2007). O gene viral *gag* foi detectado nesses alimentos crus (Olaya-Galán et al., 2017).

Outras vias possíveis de transmissão do VLB em humanos são através do sangue ou leite. Foi realizado um estudo recente em sangue humano, o qual constatou leucócitos infectados com VLB em 45% dos indivíduos (Buehring et al., 2019), o que sugere uma infecção transmitida pelo sangue. Outro possível método de transmissão em humanos que precisa ser investigado é através do aleitamento materno, bem como a exposição ao sangue no processo do parto.

2.2.4 Patogenicidade induzida por VLB

O principal alvo celular do VLB em bovinos é o linfócito B IgM+CD5+, apesar de que monócitos, linfócitos T CD8 e granulócitos também possam ser infectados (Panei et al., 2013). Quando o VLB infecta a célula alvo, um receptor de membrana faz o reconhecimento viral e permite a liberação do capsídeo no citoplasma da célula hospedeira. Há a entrada do RNA viral de fita simples, transcrição reversa e a molécula de DNA forma um complexo com a integrase e outras proteínas para introduzir o genoma viral no núcleo que finalmente se integra ao genoma do hospedeiro (Figura 4) (Lewinski & Bushman, 2005).

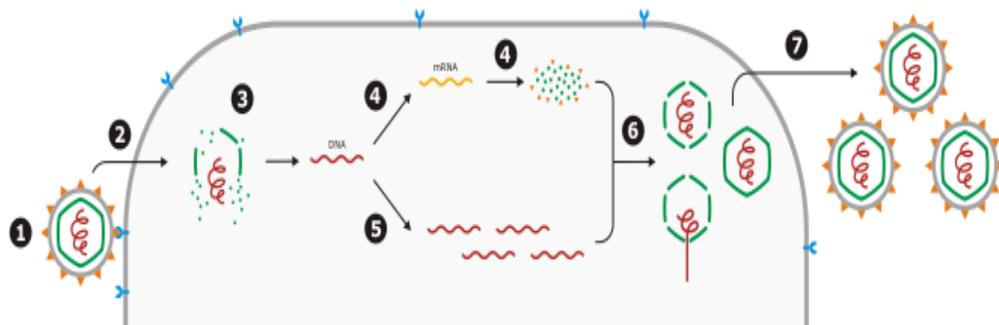


Figura 4: Visão geral de um ciclo de replicação viral hipotético. Fonte: Portal Educação.

O VLB é integrado ao genoma do hospedeiro como um provírus, o qual codifica para o ácido nucleico e proteínas para montar novas partículas virais. As partículas são liberadas pelo processo de exocitose para a produção de novos viriões infecciosos (Lewinski & Bushman, 2005). A segunda estratégia de replicação envolve a atuação de proteínas reguladoras, como *Tax*, na proliferação celular. As

duas vias de replicação viral produzem clones distintos de células infectadas (Gillet et al., 2013).

Nesta fase inicial da infecção, observa-se um aumento considerável da carga viral, devido à grande quantidade de clones gerados. Com a ativação das respostas imunes humorais e celulares do hospedeiro, há uma diminuição significativa da carga viral. A infecção se espalha através da expansão clonal das células infectadas, sem indicativo de transcrição reversa (Gillet et al., 2013; Florins et al., 2007).

Quando a infecção se espalha, o sistema imunológico do hospedeiro direciona os anticorpos específicos principalmente ao envelope estrutural gp51 e à proteína do capsídeo p24 (Gillet et al., 2013). Esse sistema de defesa persiste por toda a vida do animal, indicando que o sistema imunológico é permanentemente estimulado pelos antígenos do VLB (Florins et al., 2007).

Os mecanismos específicos de entrada ainda não são bem descritos. O receptor celular utilizado na entrada do VLB ainda não foi descoberto, acredita-se que seja a subunidade δ do complexo 3 da proteína adaptadora bovina (AP-3) (Suzuki et al., 2003). Os humanos apresentam quatro tipos de complexos AP, os quais possuem um papel importante no transporte intracelular (Robinson & Bonifacio, 2001).

A inserção de ácido nucleico de VLB ocorre frequentemente em regiões intrônicas, não há sítio específico para inserção. A inserção nessas regiões de baixa transcrição ajuda a manter a latência do vírus (Murakami et al., 2011). Os provírus presentes nos sítios em que a transcrição é inativa não são reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro. Com isso, as células infectadas se acumulam causando linfocitose ou proliferação de células B (Florins et al., 2007).

O gene *Tax* é um dos principais contribuintes para o potencial oncogênico. Sua principal função é a de transcrição viral (Sakurai et al., 1991; Willems et al., 1987). Foi descrito que *Tax* possui a capacidade de induzir a imortalização de fibroblastos primários de embrião de rato (REF) (Tajima & Aida, 2000; Willems et al., 1998) e também age em cooperação com o oncogene *Ha-ras* induzindo a transformação completa de células formadora de tumores, quando injetada em camundongos. *Tax* não é um oncogene, porém comporta-se de forma semelhante à proteína Myc (oncogene Myc) (Tajima & Aida, 2000).

Os mecanismos pelos quais *Tax* induz a transformação celular ainda estão sendo descritos, sabe-se que é responsável por estimular a sobrevivência celular ativando o fator de transcrição NF-Kb e também aumentar a expressão de TNF- α e de proteínas que impedem o processo de apoptose (como o Bcl-2), aumentando assim, a susceptibilidade à mutações no DNA celular (Takahashi et al., 2005; Twisere et al., 2003).

Os genes *gag*, *pro*, *pol* e *env* são responsáveis pelo ciclo de vida viral, infecciosidade viral e produção de viriões infecciosos (Bai et al., 2015; Harmard & Muriaux, 2011; Jewell & Manskv, 2000; Inabe et al., 1999). As proteínas *Tax* e *Rex* são essenciais para a regulação da transcrição viral, malignidade induzida pelo BLV e exportação nuclear do RNA viral para o citoplasma (Takahashi et al., 2005; Takahashi et al., 2004; Tajima et al., 2003; Tajima & Aida, 2000/2002; Willems et al., 1992/1990; Felber et al., 1989). Já as proteínas *R3* e *G4* contribuem para a manutenção das altas cargas virais, influenciando a replicação e a patogênese *in vivo* (Florins et al., 2007; Willems et al., 1994).

O gene *gag* é responsável por gerar três proteínas, a proteína de matriz p15, que se liga ao RNA genômico viral e interage com a bicamada lipídica da membrana viral (Copeland et al., 1983), a proteína do capsídeo p24, a qual é o alvo principal da resposta imunológica do hospedeiro (Willems et al., 1997; Mager et al., 1994), e a proteína nucleocapsídeo p12, que se liga ao RNA genômico empacotado (Kato et al., 1993).

As proteínas de superfície e transmembrana codificadas pelo gene *env* trabalham de forma coordenada para realizar a ligação e a fusão dos receptores de membrana celular durante a entrada do vírus (Lairmore, 2014). Também está presente no genoma de VLB miRNAs, os quais não são expressos apenas em tumores, mas também na fase assintomática da infecção (Rosewick et al., 2017).

Os miRNAs demonstraram modificar pelos menos seis genes alvos relacionados à apoptose, imunidade, sinalização celular e oncogênese (Gillet et al., 2016). Com isso, podem ter papéis no início e na progressão do tumor através de seus efeitos sobre a carga proviral e conseqüentemente na replicação viral (Gillet et al., 2016; Rosewick et al., 2013; Kincaid et al., 2012).

Além disso, alguns estudos demonstraram uma associação significativa entre a infecção pelo VLB e a regulação positiva da telomerase e a linfocitose persistente (Hemmatzadeh et al., 2015; Szczotka e Kuzmak 2013; Suzuki et al.

2008). Nestes estudos animais mais velhos infectados exibiram um aumento acentuado na atividade da telomerase, os autores concluíram que o VLB pode inibir o encurtamento dos telômeros, contribuindo assim na leucemogênese e na indução de tumores.

2.3 VLB E CÂNCER DE MAMA

Nas últimas décadas houve um interesse crescente na possível etiologia viral do câncer de mama humano. Os vírus mais amplamente explorados são o vírus do Tumor Mamário de Camundongo (MMTV), o vírus Epstein-Barr (EBV), o Papilomavírus Humano (HPV) e o VLB (Lawson et al., 2018; Buehring et al. 2014; Di Lonardo et al. 1992). Ainda não há um consenso sobre um papel viral na iniciação e/ou manutenção do câncer de mama humano, mas a influência dos vírus oncogênicos é atualmente a principal hipótese plausível para uma causa direta desse tipo de câncer (Lawson et al. 2018).

O interesse pela etiologia viral do câncer de mama teve início com a descoberta do MMTV como agente causador do câncer de mama murino. Desde então, muitos vírus, como sequências semelhantes ao EBV, HPV e MMTV, foram identificados em tumores mamários humanos (Di Lonardo et al., 1992). Em 2003, as proteínas do capsídeo do VLB foram encontradas em pessoas saudáveis (Buehring et al., 2003). No entanto, esse achado confirmou somente a exposição humana ao vírus.

Em 2006, pesquisadores na Colômbia analisaram 56 amostras de câncer de mama humano por imunohistoquímica para a glicoproteína do envelope viral, gp51 (Ochoa et al., 2006). Eles detectaram essa proteína em 7% das amostras (4/56). A proteína gp51 é codificada pelo gene *env*, sua presença também é indicativa de replicação viral (Gillet et al., 2007).

Os transcritos do gene *Tax* do VLB foram detectados pela primeira vez na Califórnia em 2014, nesse estudo foram analisadas 219 amostras de tecido mamário. A proteína do capsídeo viral p24 também foi encontrada em algumas das amostras analisadas (Buehring et al., 2014). Esses achados levantam a hipótese de que o VLB pode desempenhar algum papel no desenvolvimento e/ou progressão no câncer de mama.

Atualmente, há alguns estudos de detecção do DNA do VLB em tecidos mamários em diferentes populações, sendo que a maioria é de associação do vírus com a neoplasia mamária (Quadro 3). O DNA viral foi encontrado em mulheres colombianas (Mesa et al., 2013), argentinas (Lendez et al., 2018), norte americanas (Baltzell et al., 2018; Buehring et al., 2015/2014), australianas (Buehring et al., 2017), brasileiras – Rio Grande do Sul - (Schwingel et al., 2019) e Iranianas (Khalilian et al., 2019).

Quadro 3: Detecção do DNA do VLB em tecidos mamários humanos.

Ano	Autor	País	Número de amostras / Tecido	Método de análise	Tecido benigno	Tecido cancerígeno
2013	Mesa et al.	Colômbia	106	PCR	24/53 (45%)	20/53 (36%)
2014	Buehring et al.	EUA	219 / FFPE	IS-PCR	*	*
2015	Buehring et al.	EUA	239/ FFPE	IS-PCR	30/104 (29%)	67/114 (59%)
2016	Gillet & Willems.	EUA, México e Vietnã	51 / Dados da sequência de DNA	NGS	0	0/51 (0%)
2016	Zhang et al.	China	91 / Tecido mamário e sangue	RT/PCR? ELISA	0	0/91 (0%)
2017	Buehring et al.	Austrália	96 / FFPE	IS-PCR	19/46 (41%)	40/50 (80%)
2018	Baltzell et al.	EUA	166 / FFPE	IS-PCR	20/105 (19%)	35/61 (57%)
2018	Lendez et al.	Argentina	85 / FFPE	IS-PCR	0	19/85 (23%)
2019	Khalilian et al.	Irã	200/FFPE	<i>nested</i> PCR	4/8 (50%)	60/172 (34,9%)
2019	Schwingel et al.	Brasil	144 / FFPE	IS-PCR / NL-PCR	10/72 (14%)	22/72 (31%)

* O DNA viral foi encontrado em 44% das amostras sem diagnóstico.

Nos estudos existentes de associação do VLB com o câncer de mama, percebe-se que a presença viral geralmente é detectada em uma proporção maior em tecidos malignos do que em tecidos benignos. No entanto, em um estudo realizado na Colômbia em 2013, o DNA do VLB foi detectado em uma quantidade maior em tecidos benignos da mama (45%) do que em tecidos com câncer de mama (36%) (Mesa et al., 2013). Eles realizaram uma análise filogenética que demonstrou uma alta homologia entre as sequências de genes amplificados obtidos de tecidos mamários humanos e aqueles provenientes de bovinos com leucose depositados no GenBank.

Na Califórnia, Buehring e colaboradores realizaram um estudo de associação entre a presença do DNA do VLB e o câncer de mama, foi constatado uma frequência significativamente maior de DNA do VLB no epitélio mamário de mulheres com câncer de mama (59%) do que nos controles normais (29%) e o DNA viral também foi detectado em 38% das lesões pré-malignas, como carcinomas *in situ* (Buehring et al., 2015). Nesse mesmo estudo, a associação entre a presença viral e o câncer de mama apresentou um valor semelhante aos valores obtidos para outros fatores de risco.

Por outro lado, há dados publicados nos quais o DNA não foi encontrado em amostras mamárias. Na China realizou-se um estudo de detecção de VLB em tecidos mamários e amostras de sangue de mulheres com diagnóstico de câncer de mama, não houve a detecção de transcritos ou anticorpos contra o VLB (Zhang et al., 2016). Buehring analisou os resultados dos chineses e concluiu que os métodos utilizados não pareciam adequados, pois os chineses deixaram a desejar nas informações fornecidas sobre a técnica de PCR *in situ* utilizada e, o kit comercial ELISA que eles utilizaram era especialmente destinado ao gado, o qual possui o nível de anticorpos muito maior do que humanos (Buehring et al., 2003; Choi et al., 2002).

Outro estudo realizado por Gillet e colaboradores analisou o genoma completo de 51 tumores de mama obtidos no banco de dados NCBI (dbGaP, banco de dados NCBI de genótipo e fenótipo). Os tecidos mamários foram provenientes de mulheres dos Estados Unidos, México e Vietnã. Eles não detectaram sequências de VLB nas amostras analisadas (Gillet & Willems, 2016).

Há somente um estudo retrospectivo, no qual foi detectada a presença do VLB antes do desenvolvimento da neoplasia mamária. Esse estudo foi conduzido

por Buehring e colaboradores em amostras de 31 mulheres australianas, eles obtiveram a primeira amostra normal no momento da primeira cirurgia e a segunda amostra da mesma mama 3-10 anos depois. Nesse trabalho o DNA do VLB foi detectado em 80% das amostras malignas e 41% das amostras saudáveis (Buehring et al., 2017).

No Brasil, sabe-se que a infecção está presente e disseminada em bovinos leiteiros de várias regiões, inclusive no estado de Pernambuco (Santos et al. 2013; Barros Filho et al. 2009; Fernandes et al. 2009; Birgel Jr. et al. 2006; Carneiro et al. 2003; Luders 2001; Molnár et al. 1999; Modena et al. 1984). No entanto, há somente um estudo realizado no Sul do país sobre a associação da presença do BLV com o câncer de mama. Nesse estudo, o DNA do BLV foi detectado em 30,5% e 13,9% das amostras com câncer e amostras controle, respectivamente (Schwingel et al., 2019).

A relação entre a presença do VLB com a origem e/ou surgimento do câncer de mama humano ainda permanece controversa. É possível que, associado a outros fatores de risco, o VLB desempenhe algum papel que ainda não foi descrito. A metodologia utilizada nas análises, o background genético da população e os hábitos alimentares (como o consumo de produtos bovinos), podem estar relacionados aos resultados controversos publicados.

2.4 PREVALÊNCIA

Atualmente o VLB está emergindo como uma possível infecção zoonótica e apesar de ser considerada erradicada em várias partes do mundo, está globalmente disseminado em gado domesticado nas Américas, em partes da Europa, Ásia e Oriente Médio (Bauermann et al., 2017; Merlini et al., 2016; Polat et al., 2016; EFSA, 2015). Há mais de duas décadas, alguns países como Reino Unido, França, Alemanha, Japão, Dinamarca e Espanha realizaram programas de erradicação do VLB bem sucedidos. Oficialmente, Bélgica e Holanda estão livres da LEB (Buehring et al., 2015; Evermann & Jackson, 1997).

Na América do Norte, dados epidemiológicos demonstram a infecção presente em 83,4% dos bovinos leiteiros e 39% dos rebanhos bovinos dos Estados Unidos. E, no Canadá, a taxa de infecção é menor, com 37% de vacas infectadas (Polat et al., 2017; VanLeeuwen et al., 2001). Além dos Estados Unidos, Japão e

Argentina tem realizado esforços para desenvolver planos econômicos para sua indústria de laticínios.

Na América do Sul, o VLB está presente no gado em quase todos os países. Na Bolívia, Peru, Paraguai, Uruguai e Colômbia, as taxas individuais de infecção variam entre 19% e 54% (Polat et al., 2016; Benavides et al., Hung Ch 1983). Na Argentina, país que possui uma importante indústria de leite e carne de vaca, a maioria dos rebanhos está infectada pelo VLB (Gutiérrez et al., 2011). E no Brasil, a prevalência varia em cada estado, a taxa fica entre 17% a 60% (OIE – World Organization for Animal Health, 2018; Camargos et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

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

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Realizar a detecção do DNA do VLB a partir do DNA extraído de amostras histológicas de tecido mamário;
- 2.** Associar a frequência do VLB aos diagnósticos histológicos das pacientes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO ANALISADO

Como objeto de estudo foram avaliadas 111 amostras biológicas provenientes de pacientes do sexo feminino, com idade entre 20 e 70 anos (idade média de 46,38 anos), da região metropolitana do Recife, Nordeste do Brasil. Foram utilizados materiais de tecido mamário parafinado e fresco, obtidos do Hospital das Clínicas (UFPE) e Hospital Barão de Lucena (HBL), Recife – Pernambuco.

As amostras parafinadas foram obtidas a partir de cirurgias e emblocadas entre os anos de 2009 a 2014 e as amostras de tecido mamário fresco foram obtidas a partir do exame de *core biopsy* e posteriormente armazenadas em RNAlater Solution (Ambion®) a -80°C, a coleta do material fresco ocorreu entre o período de Junho de 2012 a Dezembro de 2015.

Do total de amostras, 46 foram classificadas em alterações benignas, 27 em carcinomas (sendo 25 ductal invasivo e 2 apenas carcinoma invasor) e 38 estavam sem o resultado histopatológico (Quadro 4). A amostra padrão utilizada para validar os resultados da PCR foi proveniente do Laboratório de Virologia – UFRPE, uma cultura de células FLK infectadas com VLB.

Quadro 4: Diagnósticos histopatológicos das amostras analisadas

QUANTIDADE	DIAGNÓSTICO HISTOLOGICO
25	Carcinoma ductal invasivo
25	Fibroadenomas
11	Alterações benignas (não especificado)
3	Adenose
2	Carcinoma invasivo (não especificado)
1	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
1	Fibroesclerose
1	Mastite crônica
1	Esclerose stromal
1	Hiperplasia ductal usual focal e intensa hialinização estromal
1	Fibrose e elastose
1	Hiperplasia pseudoangiomatose do estroma
38	Sem resultado histológico

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, sob o número CAAE: 28508614.9.0000.5208 (Anexo 1). As pacientes foram informadas sobre os objetivos da pesquisa, procedimentos a serem realizados, bem como os riscos e benefícios da sua participação no estudo. Todas as pacientes que concordaram em participar desse estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA genômico e viral foi realizada com a utilização do Kit DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, todas as amostras foram quantificadas em um espectrofotômetro (NanoVue Plus Spectrophotometer) e a qualidade do DNA foi confirmada por PCR, com a amplificação de um fragmento de 110 pares de base (pb) do gene da β -globina, utilizando os primers especificados na Tabela 1. As condições da PCR foram: 95°C durante 5 minutos; seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C; e extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em um gel de agarose a 2%, por 30 minutos a 100 volts e corado em brometo de etídio.

Tabela 1 – Sequências dos oligonucleotídeos e tamanhos dos fragmentos

Primers	Sequência (5'→3')	Tamanho (pb)	Referência
β -globina			
PC04	ACACAACCTGTGTTCACTAGC	110pb	Baldez, <i>et al.</i> , (2009)
GH20	CAACTTCATCCACGTTCCACC		
LTR	F: TAGGAGCCGCCACCGC	329pb	Buehring et al., 2014
	R: GCGGTGGTCTCAGCCGA		
	F:AAACTGCAGCGTAAACCAGACAGAGACG	290pb	
	R: CACCCTCCAAACCGTGCTTG		
Tax	F: CTTCGGGATCCATTACCTGA	373pb	Buehring et al., 2014
	R: GCTCGAAGGGGAAAGTGAA		
	F: ATGTCACCATCGATGCCTGG	113pb	

<i>gag</i> (p24)	R: CATCGGCCGGTCCAGTTGATA	385pb	Buehring et al., 2014
	F: AACACTACGACTTGCAATCC		
	R: GGTTCCCTTAGGACTCCGTCG	272pb	
	F: ACCCTACTCCGGCTGACCTA		
R: CTTGGACGATGGTGGACCAA			

4.4 DETECÇÃO DO DNA VIRAL

A detecção do DNA do BLV foi realizada através da técnica *Polimerase Chain Reaction* (PCR) *nested*, utilizando-se primers específicos para os genes *Tax*, *LTR* e *gag* do VLB (Tabela 1) de acordo com as condições de amplificação descritas no trabalho de Buehring (2014). A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 µL em tubos tipo Eppendorf de 0.2 µL. As condições de PCR para os primers foram: desnaturação inicial (95°C / 2min), seguida de 30 ciclos de desnaturação (95°C / 30s), anelamento (55°C / 30s) e extensão (72°C / 20s); e uma extensão final (72°C / 5min) na primeira etapa da PCR. Na segunda etapa a variação ocorreu somente na temperatura de anelamento, sendo (60°C / 30s) para os primers *LTR* e *Tax* e (62°C / 30s) para o primer *Gag*. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, a detecção do DNA viral foi confirmada por meio da amplificação dos tamanhos de pares de bases correspondentes aos genes analisados. A amostra padrão foi utilizada como controle positivo em todas as reações de PCR.

5. RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO DA *NESTED* PCR

Anteriormente à detecção viral nas amostras, foram realizados testes iniciais com a amostra padrão, uma cultura de células infectadas com VLB. Após a extração e quantificação do DNA, a amostra foi testada com os primers *Tax*, *LTR* e *gag* de acordo com as condições de amplificação descritas no trabalho de Buehring (2014). No entanto, foram necessárias mudanças nas temperaturas de anelamento para melhor visualização dos respectivos fragmentos (Tabela 2).

Tabela 2 – Mudanças de temperaturas na padronização da *nested* PCR

Primers	Temperaturas de anelamento (Buehring et al., 2014)	Temperaturas de anelamento utilizadas
<i>LTR</i>	57/58	55/60
<i>Tax</i>	55/55	55/60
<i>gag</i>	54/56	55/62

Os primers *Tax* e *LTR* obtiveram uma melhor amplificação com a elevação da temperatura para 60°C, e *gag* para 62°C (Figuras 5, 6 e 7). Os fragmentos obtidos foram sequenciados e confirmados. Posteriormente, a amostra padrão foi testada em diferentes quantidades de volume e também diluída a fim de determinar a quantidade mínima necessária de DNA para amplificação, sendo o resultado 23,4ng de DNA. Com isso, o protocolo da reação da PCR foi padronizado (Tabela 3).

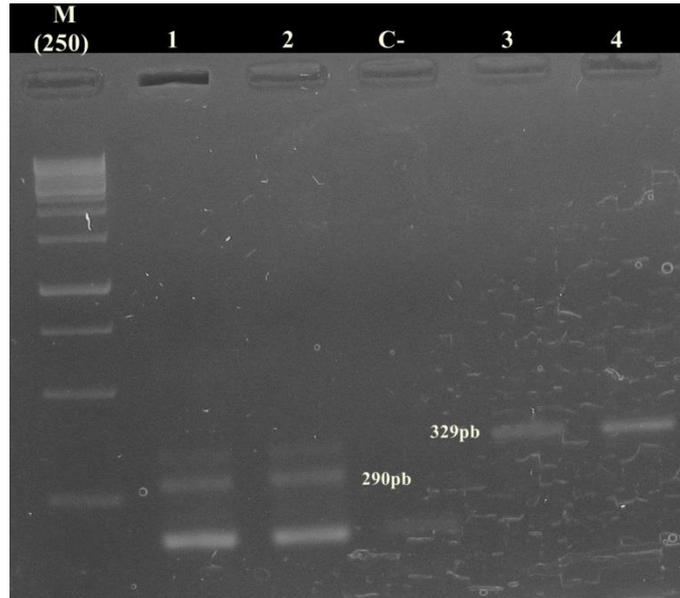


Figura 5: Padronização da Nested PCR (LTR). (M 250pb) GeneRuler 1kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*); (1 e 2) amplicons internos com o tamanho esperado, 290pb; (C-) Controle negativo; (3 e 4) amplicons externos com o tamanho esperado, 329pb.

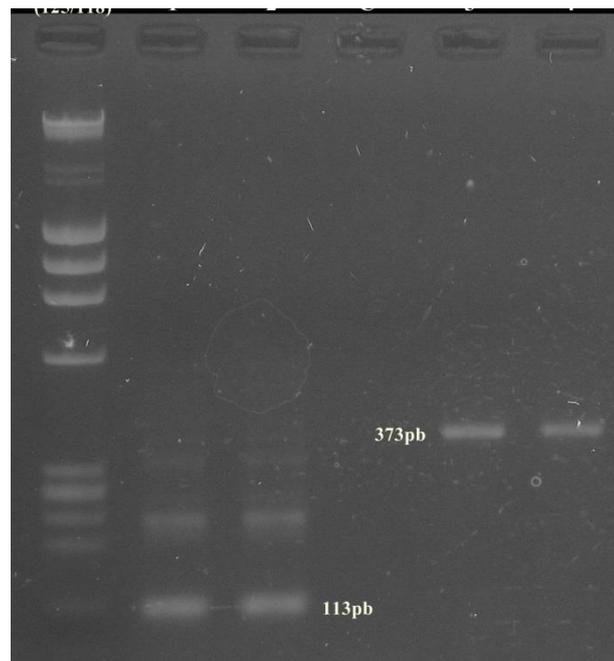


Figura 6: Padronização da Nested PCR (Tax). (M 125/118pb) Quick-Load DNA Marker (New England BioLabs); (1 e 2) amplicons internos com o tamanho esperado, 113pb; (C-) Controle negativo; (3 e 4) amplicons externos com o tamanho esperado, 373pb.

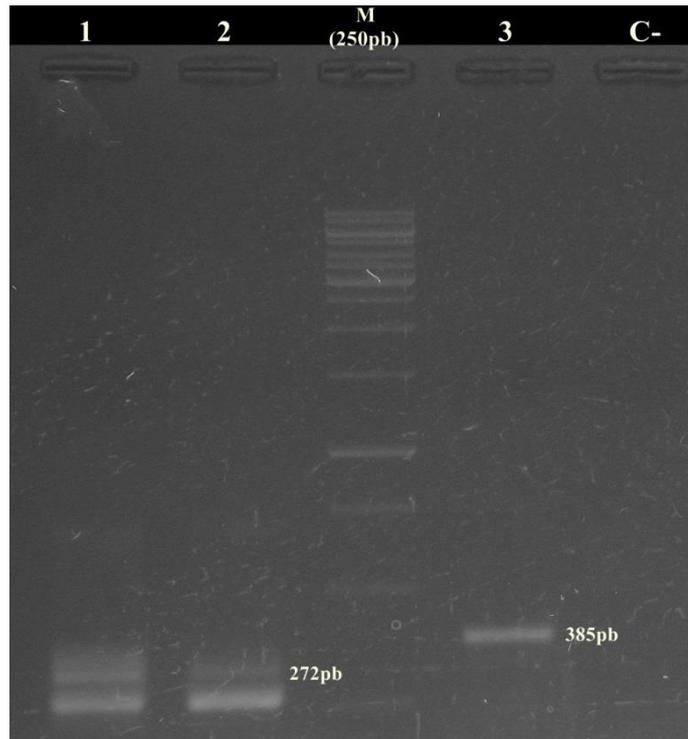


Figura 7: Padronização da *Nested PCR (Gag)*. (1 e 2) Amplicons internos com o tamanho esperado, 272pb; (M 250pb) GeneRuler 1kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*); (3) Amplicon externo com o tamanho esperado, 385pb; (C-) Controle negativo.

Tabela 3 – Protocolo padronizado da reação da *nested PCR*

Solução	Volume na reação
DNA	Variável
Iniciadores Forward	1 μ L (10 pmol)
Iniciadores Reverse	1 μ L (10 pmol)
Mastermix	12,5 μ L
H2O	Variável
Volume final	25 μ L

5.2 DETECÇÃO DO DNA DO VLB EM TECIDOS MAMÁRIOS

A fim de avaliar a qualidade do DNA das amostras, foram realizadas PCRs que amplificam o gene β -globina. Todas as amostras mostraram-se positivas para o gene, indicando que o DNA estava disponível para a análise molecular. Após a

quantificação do DNA, todas as amostras foram analisadas através da *nested* PCR com o objetivo de detectar a presença do VLB.

O DNA do VLB foi encontrado em 73/111 (65,7%) amostras mamárias, sendo positivas para *Tax* 71/111 (63,9%), para *LTR* 2/38 (5,2%) e para *gag* 1/73 (1,3%). As amostras confirmadas por PCR apresentaram amplicons de tamanho esperado, 113pb para *Tax* (Figura 8), 290pb para *LTR* (Figura 9) e 272pb para *gag* (Figura 10).

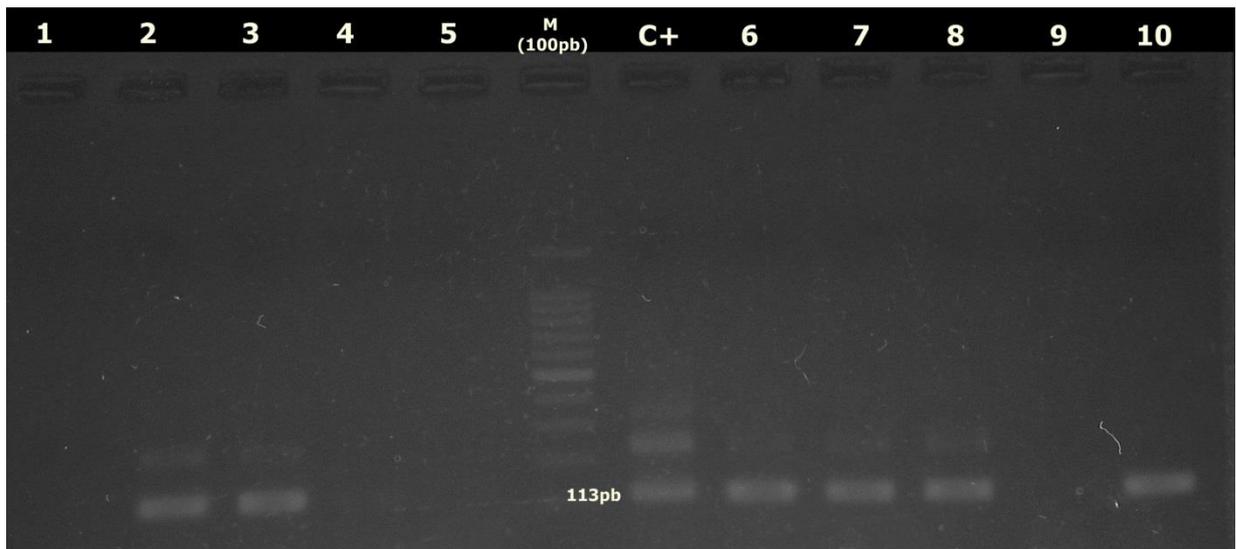


Figura 8: Detecção do DNA de VLB em amostras de tecido mamário com o primer *Tax*. (1) Amostra negativa; (2 e 3) amostras positivas; (4 e 5) amostras negativas; (M 100pb) Ladder/M1061 (*Sinapse ine*); (C+) controle positivo; (6-8) amostras positivas; (9) amostra negativa; (10) amostra positiva.



Figura 9: Detecção do DNA de VLB em amostras de tecido mamário com o primer *LTR*. (M 250pb) GeneRuler 1kb DNA Ladder (*Thermo Scientific*); (1 e 2) amostras negativas; (3) amostra positiva; (4 e 5) amostras negativas; (6) amostra positiva.

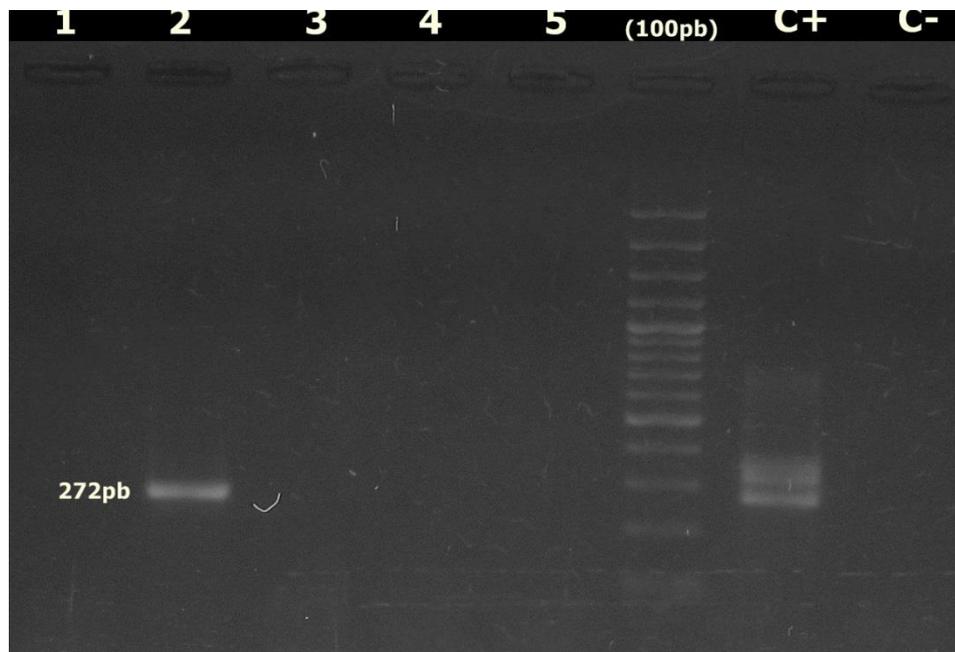


Figura 10: Detecção do DNA de VLB em amostras de tecido mamário com o primer *gag*. (1) amostra negativa; (2) amostra positiva; (3-5) amostras negativas; (M 100pb) Ladder/M1061 (*Sinapse ine*); (C+) controle positivo; (C-) controle negativo.

5.3 ANÁLISE DIAGNÓSTICA DAS AMOSTRAS

Considerando o diagnóstico histopatológico das amostras, o DNA do VLB foi encontrado em 81% (22/27) amostras de câncer de mama, sendo predominante o carcinoma ductal invasivo, e em 73% (34/46) amostras com alterações benignas, sendo a maioria fibroadenomas (Gráfico 1). Esses resultados indicam uma associação positiva entre a presença do DNA do VLB e o câncer de mama (*odds ratio* = 1.67; 95% intervalo de confiança = 0.51-5.4). No entanto, estatisticamente a associação não foi significativa ($p = 0.57$). O DNA viral também foi encontrado em 44,7% (17/38) amostras que não tiveram os respectivos diagnósticos disponibilizados (Quadro 5).

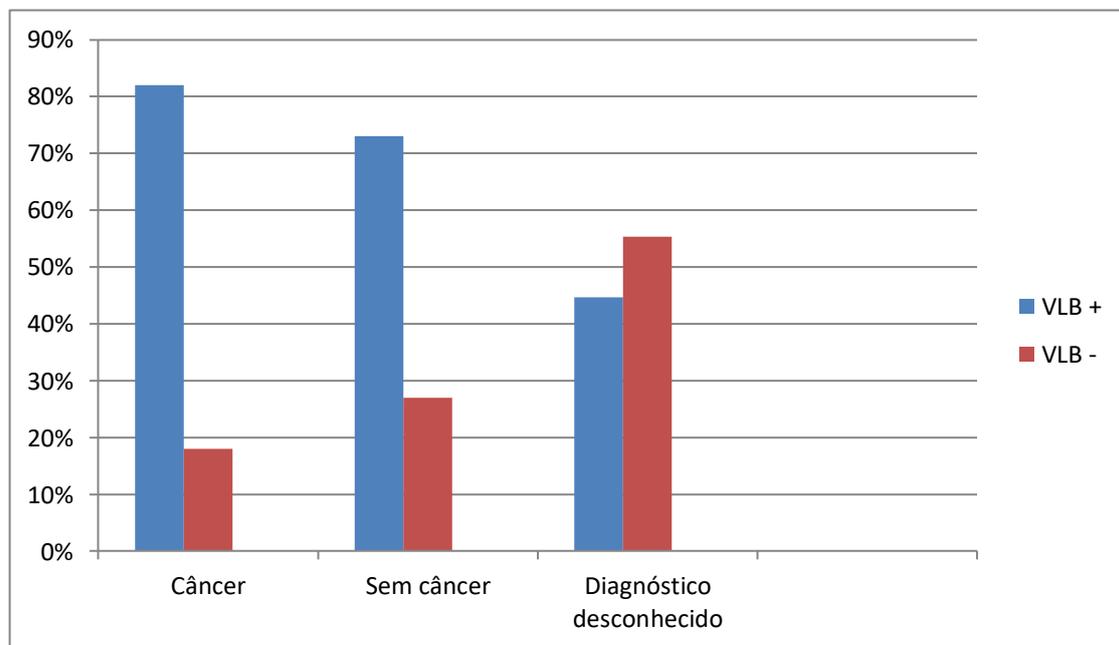


Gráfico 1: Frequência do VLB nas amostras mamárias

Quadro 5: Diagnósticos histopatológicos das amostras positivas para o VLB.

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLOGICO	QUANTIDADE DE AMOSTRAS POSITIVAS
Carcinoma ductal invasivo	20/25
Fibroadenomas	22/25
Alterações benignas (não especificado)	8/11
Carcinoma invasivo (não especificado)	2/2
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	1/1
Fibroesclerose	1/1
Hiperplasia ductal usual focal e intensa hialinização estromal	1/1
Fibrose e elastose	1/1
Sem resultado histológico	17/38
TOTAL DE AMOSTRAS	73/111

6 DISCUSSÃO

O VLB está emergindo como uma possível infecção zoonótica, é um vírus que está se disseminando globalmente em gado domesticado (Bauermann et al., 2017; Merlini et al., 2016; Polat et al., 2016; EFSA, 2015). É responsável por causar grandes perdas econômicas pela redução da produtividade em bovinos, restrição à exportação de gado e seus produtos, alta morbidade e mortalidade (Valii, 2007). E, apesar de desenvolver o estágio maligno da leucose somente em uma pequena proporção dos animais infectados, os animais que desenvolvem linfocitose persistente são a principal fonte de carne e leite comercializados (Olaya et al., 2017; Nagy, 2014).

Ainda não se sabe a maneira exata pela qual o VLB é transmitido aos seres humanos, por muitos anos acreditava-se que a infecção por esse vírus era restrita aos animais (Burrige, 1981). No entanto, essa teoria agora é refutada, pois as evidências de infecção em seres humanos vêm se acumulando nos últimos anos. Atualmente sabe-se que o VLB pode estar presente na mama (Khalilian et al., 2019; Schwingel et al., 2019; Baltzell et al., 2018; Lendez et al., 2018; Buehring et al., 2017; Buehring et al., 2015/2014; Mesa et al., 2013), pulmão (Robinson et al., 2016) e células sanguíneas (Buehring et al., 2019) em humanos.

Nos últimos cinco anos, foram realizados vários estudos de detecção de VLB em tecidos mamários em diferentes populações, sendo a maioria de associação da presença do VLB com o câncer de mama. Em nosso estudo, a presença do VLB em amostras mamárias humanas foi detectada pela primeira vez no Nordeste do Brasil. O DNA viral foi encontrado em 65,7% das amostras, por meio da técnica *nested* PCR com a utilização dos primers *Tax*, *LTR* e *gag* com as taxas de detecção 63,9%, 5,2% e 1,3% respectivamente. A maioria dos estudos de detecção do VLB também utilizaram os genes *Tax* e *LTR* por serem as regiões mais altamente conservadas do genoma viral (Zhao et al., 2007). A região *gag* é frequentemente deletada durante a progressão de leucemias e linfomas para estágios avançados (Gillet et al., 2007, Zhao & Buehring, 2007), presumivelmente para escapar da resposta imune do hospedeiro, o que explicaria a baixa taxa de detecção com esse gene em nosso trabalho.

Quanto à técnica de detecção, optamos pela *nested* PCR. No entanto, uma variedade de métodos de PCR tem sido utilizada em todo o mundo para a detecção

de VLB, dentre elas estão a PCR padrão (Monti et al., 2005; Kurdi et al., 1999), *nested* PCR (Tajima et al., 2003; Zaghawa, 2002; Tajima et al., 1998), PCR quantitativa em tempo real – qPCR (Takeshima et al., 2015; Somura et al., 2014; Tawfeeq et al., 2013) e PCR baseada em sangue (Nishimori et al., 2016; Takeshima et al., 2016). Além dos genes anteriormente citados, as técnicas também possuem como alvo os genes *pol* e *env*.

Em nosso estudo, a presença do DNA do VLB foi constatada em uma proporção maior nas pessoas com câncer de mama (81%), do que nas pessoas com alterações benignas (73%), esses resultados indicam uma associação positiva entre a presença viral e o câncer mamário (*odds ratio* = 1,67). No entanto, estatisticamente a associação não foi significativa ($p = 0.57$), pois a frequência encontrada do DNA do VLB em ambos os tipos de tecidos benignos e malignos, foram aparentemente altas.

Estudos anteriores de associação do VLB com o câncer mamário também constataram a presença do VLB em uma frequência maior em tecidos malignos do que em tecidos sem histórico de câncer (Baltzell et al., 2018; Buehring et al., 2015/2017; Giovanna et al., 2013). Em nossa pesquisa a frequência do VLB nas amostras benignas foi relativamente maior em comparação com os outros estudos, nos quais a taxa de detecção nesse tipo de tecido varia entre 14% e 45%.

Em nossos resultados, a presença do VLB nos carcinomas mamários é semelhante aos achados de Buehring em uma pesquisa realizada na Austrália, na qual o DNA do VLB foi detectado em 80% (40/50) das amostras de câncer de mama humano (Buehring et al., 2017). As altas taxas de detecção encontradas neste trabalho e de Buehring podem ser devido à pequena quantidade de amostras utilizadas para cada grupo no estudo. Pode-se citar como outro fator limitante desse estudo, a dificuldade na obtenção dos diagnósticos dos restantes das amostras analisadas, o que diminui o poder de análise da associação da presença do VLB com os diagnósticos histológicos das amostras.

Por outro lado, a relação entre a presença do VLB com a origem e/ou o surgimento de câncer de mama humano ainda permanece controverso, há dados nos quais o DNA do VLB não foi encontrado em amostras mamárias (Gillet & Willems, 2016; Zhang et al., 2016). Gillet e colaboradores analisaram o genoma completo de 51 tumores de mama de mulheres norte americanas, mexicanas e vietnamitas, obtidos no banco de dados do NCBI (dbGaP, banco de dados de

genótipo e fenótipo do NCBI). Eles não obtiveram resultados positivos. E, na China, pesquisadores não encontraram o vírus em amostras de câncer de mama (Zhang et., 2016). No entanto, de acordo com a análise dos resultados feita por Buehring, os métodos que foram utilizados pelos chineses não pareciam adequados (Buehring et al, 2017). É possível que o fato de alguns pesquisadores não encontrarem o VLB em carcinomas de mama esteja relacionado à metodologia utilizada e à população em que o estudo foi realizado (Buehring & Sans, 2019).

Ainda não há prova de associação da infecção por VLB e o câncer de mama humano. Entretanto, com base em critérios de causalidade bem definidos, a infecção por VLB pode ser considerada um dos fatores de risco (Buehring & Sans, 2019). De acordo com os critérios epidemiológicos de Hill (Hill, 1965), os dados publicados sobre a infecção por VLB em tecido mamário humano já torna possível a aplicação dos quatro primeiros critérios, os quais são a forte relação entre o potencial fator de risco e a doença em questão, a consistência dos resultados, especificidade da associação do agente causal e doença e a exposição que deve preceder o resultado.

Atualmente, há um único estudo prospectivo realizado por Buehring na Austrália, no qual o DNA do VLB foi detectado em amostras de pacientes 3-10 anos antes do desenvolvimento do tumor maligno (Buehring et al., 2017). Esses resultados são consistentes com a suposição de uma relação temporal causativa entre a infecção por VLB e o subsequente desenvolvimento do câncer. Esse tipo de estudo é geralmente muito difícil porque requer a coleta de duas amostras do mesmo paciente em anos de intervalo.

Detectar o DNA viral em tecido canceroso é apenas um elo inicial para qualquer associação entre o VLB e o câncer de mama. O desenvolvimento do câncer é o resultado de interações complexas entre fatores genéticos e epigenéticos. Em qualquer caso que um vírus esteja associado ao desenvolvimento do câncer, a presença viral deve ser acompanhada de outros fatores inerentes ao indivíduo e ao ambiente que estimula a transformação celular (Schiller et I., 2014). Ou seja, na maioria dos casos, a infecção viral é necessária, mas não o suficiente para o desenvolvimento da neoplasia (Sarid & Gao, 2011).

Dentre as semelhanças apresentadas pelo VLB com o HTLV, ambos induzem infecções semelhantes com ausência de viremia crônica e um longo período de latência, com isso pode ser possível que o VLB desempenhe algum papel no câncer

de mama humano (Gillet et al., 2007; Florins et al., 2007). Um possível mecanismo de ação carcinogênica de ambos é a inibição do reparo do DNA celular (Philpott & Buehring, 1999), no caso do VLB, papel desempenhado pela proteína *Tax*, isso explicaria a forma como certos genes mutados (BRCA1 e BRCA2) contribuem para o desenvolvimento do câncer de mama (Buehring & Sans, 2019).

Nosso estudo fornece informações adicionais sobre a infecção por VLB na mama humana. São necessários estudos prospectivos com um número maior de amostras para fortalecer os achados atuais e confirmar se realmente o VLB é um fator de risco para o câncer de mama, pois é um vírus distribuído mundialmente e existem vários casos em que os humanos podem ser expostos. Com isso, a comprovação desse vínculo melhoraria as estratégias preventivas do câncer de mama.

7 CONCLUSÕES

- Pela primeira vez no Nordeste do Brasil foi detectado o DNA do VLB em tecidos mamários humanos. A taxa de detecção encontrada no nosso estudo foi de 65,7%;
- O DNA do VLB foi encontrado em uma proporção maior nas amostras com câncer de mama (81%) do que nas amostras benignas (73%), com isso, o DNA viral foi associado positivamente com o câncer de mama.
- Estes achados abrem caminhos para que mais pesquisas sejam realizadas, com um maior número de amostras, a fim de contribuir para o entendimento do possível papel causal da infecção por VLB com o câncer de mama.

REFERÊNCIAS

- ABABNEH M.M.; AL-RUKIBAT R.K.; HANANEH W.M.; NASAR A.T.; AL-ZGHOUL M.B. Detection and molecular characterization of bovine leukemia viruses from Jordan. **Archives of Virology**. n. 157, p. 2343–2348. 2012.
- ABREU J.M.G.; ARAUJO W. P.; BIRGEL E. H. Prevalência de anticorpos séricos antivírus da Leucose Bovina em animais criados na Bacia Leiteira de Fortaleza, Estado do Ceará. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da UFB**. v. 17. p. 67-89. 1994.
- ANGELOS J.A. and THURMOND M.C. Bovine lymphoma, Internal Medicine In: Large Animal, 4th ed. (Smith, B.P. ed.). **Mosby Elsevier, St. Louis**. p. 1173-1176. 2008.
- ANTONIOU A.; PHAROAH PD.; NAROD S. *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. **The American Journal of Human Genetics**. v. 72. p. 1117-1130. 2003.
- BAI L.; OTSUKI H.; SATO H.; KOHARA J.; ISOGAI E.; TAKESHIMA S. N.; AIDA Y. Identification and characterization of common B cell epitope in bovine leukemia virus via high-throughput peptide screening system in infected cattle. **Retrovirology**. v. 12. n. 106. 2005.
- BALTZELL K.; SHEN H.M.; KRISHNAMURTY S.; SISON J.; NUOVO G.; BUEHRING G.C. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not co-infection with human papillomavirus: Case-control study of Texas women. **Cancer** 2018. v. 124, p. 1342–1349. 2018.
- BAREZ P.Y.; BROGNIEZ A.; CARPENTIER A. *et al.* Recent advances in BLV research. **Viruses**. v. 7. n.11. p. 6080-6088. 2015.
- BARNES N.L.; OOI J.L.; YARNOLD J.R.; BUNDRED N.J. Ductal carcinoma *in situ* of the breast. **British Medical Journal**. v. 344, n. 797. 2012.
- BAUERMANN F. V.; RIDPATH J. F.; DARGATZ D. A. Bovine leukemia virus seroprevalence among cattle presented for slaughter in the United States. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation** v. 29. p. 704–706. 2017.
- BAZZUCCHI M.; ISCARO C.; CASCIARI C.; GIAMMARIOLI M.; FELIZIANI F. Molecular characterization of Italian bovine leukemia virus isolates reveals the presence of distinct phylogenetic clusters. **Archives of Virology**. v. 164. p. 1697–1703. 2019.
- BENAVIDES BENAVIDES B.; ALEJANDRO D.; QUEVEDO C.; FERNANDA M. S.; CRUZ L.; Epidemiological study of bovine leukemia virus in dairy cows in six herds in the municipality of Pasto, Nariño. **Lasallista Investigation**. v.10. n.1. p.18-23. 2013.
- BHARGAVA R. *et al.* Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy: a single institutional experience with 359 cases. **Cancer**. v. 116. p. 1431–1439. 2010.

BIANCHINI G. *et al.* The immune system and response to HER2-targeted treatment in breast cancer. **Lancet Oncology**. v. 15. p. 58–68. 2014.

BRAY *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **American Cancer Society**. 2018.

BUEHRING G.C.; DELANEY A.; SHEN H.M.; CHU D.L.; RAZAVIAN N.; SCHWARTZ D.A.; DEMKOVICH Z.R.; BATES M.N. Bovine leukemia virus discovered in human blood. **BMC Infections Diseases**. v. 19. n. 297. 2019.

BUEHRING G.C.; PHILPOTT S.M.; CHOI K.Y. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. **AIDS Research and Human Retroviruses**. v. 19. n. 12. p. 1105–1113. 2003.

BUEHRING G.C. Response to “lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients”. **Breast Cancer Research**. v. 19. n. 1. p. 24. 2017.

BUEHRING G.C.; SHEN H.M.; JENSEN H.M.; JIN D.L.; HUDES M.; BLOCK G. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: A case-control study. **PLoS ONE**. 2015.

BUEHRING G.C.; SHEN H.M.; JENSEN H.M.; YEON C.K.; SUN D.; NUOVO G. Bovine Leukemia Virus DNA in Human Breast Tissue. **Emerging Infectious Diseases Journal**. v. 20. n. 5. p. 772-782. 2014.

BUEHRING G.C.; SHEN H.; SCHWARTZ D.A.; LAWSON J.S. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development. **PLoS One** v. 12. 2017.

CAMARGOS M.F.; PEREDA A.; STANCEK D.; ROCHA M.A.; REIS J.K.P.; GREISER-W.; LEITE R.C. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine Leukemia Virus. **Virus Genes** v. 34. p. 343–350. 2007.

CAMPA D. *et al.* Genetic risk variants associated with in situ breast cancer. **Breast Cancer Research**. v. 17. n. 1. p. 82. 2015.

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

CANCER TIA. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, 1 edition. **World Health Organization**. 2003.

CHEANG M.C.U. *et al.* Immunohistochemical detection using the new rabbit monoclonal antibody SP1 of estrogen receptor in breast cancer is superior to mouse monoclonal antibody 1D5 in predicting survival. **Journal of Clinical Oncology**. v. 24. p. 5637–5644. 2006.

CHEANG M.C.U. *et al.* Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 101. p. 736–750. 2009.

CONTRACTOR K.B. *et al.* Male breast cancer: is the scenario changing. **World Journal of Surgical Oncology**. v. 6. n. 58. 2008.

DI LONARDO A. *et al.* Human papillomavirus in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 21. p. 95–100. 1992.

EFSA AHAW PANEL. Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. **EFSA J**. v. 13. p. 4188–4251. 2015.

EVERMANN J.F.; JACKSON M.K.; Laboratory diagnostic tests for retroviral infections in dairy and beef cattle, **Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice**. v. 13. n. 1. p. 87-106. 1997.

FELBER B.K.; DERSE D.; ATHANASSOPOULOS A.; CAMPBELL M.; ANDPAVLAKIS G.N. Cross - activation of the Rex proteins of HTLV - I and BLV and of the Rev protein of HIV-1 and non reciprocal interactions with their RNA responsive elements. **New Biology**. v. 1. p. 318–328. 1989.

FLORINS A.; BOXUS M.; VANDERMEERS F.; VERLAETEN O.; BOUZAR A.B.; DEFOICHE J. *et al.* Emphasis on cell turn over in two hosts infected by bovine leukemia virus : arationale for host susceptibility to disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 125. p. 17. 2008.

FLORINS A.; GILLET N.; ASQUITH B. *et al.* Cell dynamics and immune response to BLV infection: a unifying model. **Frontiers in Bioscience**. v. 12. p. 1520–1531. 2007.

GAUTAM S.; MISHRA N.; KALAIYARASU S.; JHADE S.K.; SOOD R. Molecular characterization of bovine leukaemia virus (BLV) strains reveals existence of genotype 6 in cattle in India with evidence of a new subgenotype. **Transboundary and Emerging Diseases**. v. 65. n. 6. 2018.

GILLET N.A.; WILLEMS L. Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. **Retrovirology** . v. 13. p. 1–7. 2016.

GILLET N.; FLORINS A.; BOXUS M.; BURTEAU C.; NIGRO A.; VANDERMEERS F. *et al.* Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**. v. 4. n. 18. 2007.

GILLET N.; GUTIERREZ G.; RODRIGUEZ S.M. *et al.* Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection. **PLoS Pathogens**. v. 9. n. 10. 2013.

GLENN W.K.; HENG B.; DELPRADO W.; IACOPETTA B.; WHITAKER N.J.; LAWSON J.S. Epstein-Barr virus, human papillomavirus and mouse mammary tumour virus as multiple viruses in breast cancer. **PLoS One**. v. 7. 2012.

GRAVES D.; FERRER J. In Vitro Transmission and Propagation of the Bovine Leukemia Virus in Monolayer Cell Cultures. **Cancer Research**. v. 36. p. 4152-4159. 1976.

- GUTIÉRREZ G.; ALVAREZ I.; POLITZKI R.; LOMÓNACO M.; DUS SANTOS M.J.; RONDELLI F. *et al.* Natural progression of bovine leukemia virus infection in Argentinian dairy cattle. **Veterinary Microbiology**. v. 151. p. 255–63. 2011.
- HAMMOND M.E.H. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Archives of Pathology Laboratory Medicine**. v. 134. p. 48–72. 2010.
- HAMARD P. E.; MURIAUX D. Retroviral matrix and lipids, the intimate interaction. **Retrovirology**. v. 8. n. 15. 2011.
- HONDERMARCK H. *et al.* Proteomics of breast cancer: the quest for markers and therapeutic targets. **J. Proteome Research**. v. 7. p. 1403–1411. 2008.
- HOPKINS S.G.; DIGIACOMO R.F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v. 13. n. 1. p. 107–128. 1997.
- HUNG C.H.A. Bovine leukaemia virus infection in Peru. **Tropical Animal Health and Production**. n. 15. p. 61–61. 1983.
- INABE K.; NISHIZAWA M.; TAJIMA S.; IKUTA K.; AIDA Y. The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. **Journal of Virology**. n. 73. p. 1293–301. 1999.
- JEWELL N.A.; MANSKY L.M. The beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. **Journal of General Virology**. n. 81. p. 1889–99. 2000.
- JOHNSON R.; GIBSON C.D.; KANEENE J.B. Bovine leukemia virus: A herd-based control strategy. **Preventive Veterinary Medicine**. n. 3. p. 339–349. 1985.
- KALE M.; BULUT O.; YAPK O.; GULAY M.S.; PEHLIVANOGLU F.; ATA A.; YAVRU S. Effects of subclinical bovine leukemia virus infection on some production parameters in a dairy farm in southern Turkey. **Journal of the South African Veterinary Association**. v. 78. n. 3. p. 130–132. 2007.
- KAO J. *et al.* RNA interference-based functional dissection of the 17q12 amplicon in breast cancer reveals contribution of coamplified genes. **Genes. Chromosomes Cancer**. n. 45. p. 761–769. 2006.
- KAMIŃSKA M.; CISZEWSKI T.; ŁOPACKA-SZATAN K.; MIOTŁA P. S. E. Breast cancer risk factors. **Przegląd Menopauzalny**. v.14. n. 3. p. 196–202. 2015.
- LASSAUZET M.L.; THURMOND M.C.; JOHNSON W.O. HOLMBERG C.A. Factors associated with in utero or periparturient transmission of bovine leukemia virus in calves on a California dairy. **Canadian Journal of Veterinary Research**. n. 55. p. 264–8. 1991.

LAWSON JS, SALMONS B AND GLENN WK (2018) Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein–Barr Virus (EBV). **Frontiers in Oncology**. v. 8. n. 1. 2018.

LEE L.C.; SCARRETT W.K.; BUEHRING G.C.; SAUNDERS G.K. Bovine leukemia virus infection in a juvenile alpaca with multicentric lymphoma. **Canadian Journal of Veterinary Research**. n. 53. p. 283–6. 2012.

LEE E.; KIM E.; RATTHANOPHART J.; VITONPONG R.; KIM B.; CHO I.; SONG J.; LEE K.; SHIN, Y. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. **Infections, Genetics and Evolution**. n. 41. p. 245–254. 2016.

LENDEZ P.; NIETO FARIAS M.; BUEHRING G.; SHEN H.; DOLCINI G.; CERIANI M. Bovine leukemia virus associated with mammary epithelial cell proliferation in Argentinian women. In Proceedings of the XI Argentinian Virology Congress and II Latinoamerican. **Virology Congress**. 2015.

LEONARD G.D.; SWAIN S.M. Ductal carcinoma in situ, complexities and challenges. **Journal of the National Cancer Institute**. n. 96. p. 906–20. 2004.

LEWINSKI M.K.; BUSHMAN F.D. Retroviral DNA integration—mechanism and consequences. **Advanced Genetics**. n. 55. p. 147–81. 2005.

MERCKT H.; GIUDICE J.C.O.; MULLER J.A. Leucose bovina: concepção moderna e primeira verificação da doença no Rio Grande do Sul. **Revista da Escola de Agricultura e Veterinária UFRGS**. v.2. n.3. p.7-19. 1959.

MERLINI R. *et al.* Bovine leukemia virus becomes established in dairy herds before the first lactation. **Archives of Virology**. n. 161. p. 3215–3217. 2016.

MESA G.; ULLOA J.C.; URIBE A.M.; GUTIERREZ M.F. Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue. **Open Journal of Medical Microbiology**. n. 3. p. 84–90. 2013.

MILLER J.M.; OLSON L.D.; GILLETTE K.G. Virus-like particles in phytohemagglutinin stimulated lymphocytes cultures with reference to bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**. n. 43. p. 1297–1305. 1969.

MURAKAMI H. *et al.* Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia. **Virus Research**. n. 156. p. 107–112. 2011.

OCHIRKHUU N.; KONNAI S.; ODBILEG R.; NISHIMORI A.; OKAGAWA T.; MURATA S.; OHASHI K. Detection of bovine leukemia virus and identification of its genotype in Mongolian cattle. **Archives of Virology**. n. 161. p. 985–991. 2016.

OCHOA C.A.; URIBE A.; GUTIÉRREZ M. Estudio del potencial zoonótico del virus de la leucosis bovina y su presencia en casos de cáncer de seno. **Universitas Scientiarum**. v. 11. n. 2. p. 31–40. 2006.

OLAYA G. N.N.; CORREDOR F.A.P.; GUZMÁN G.T.C.; RÍOS H.K.S.; SALAS C.S.P.; PATARROYO MA *et al.* Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. **Epidemiology & Infection**. n. 145. p. 3125–30. 2017.

OLSON C.; MILLER J.M. History and terminology of enzootic bovine leukosis. In: Burny, A.; Mammerickx, M. (eds). *Enzootic Bovine Leukosis and Bovine Leukemia Virus*. **Martinus Nijhoff Publishing**, p. 3-11. 1987.

OOSHIRO M.; KONNAI S.; KATAGIRI Y. *et al.* Horizontal transmission of bovine leukemia virus from lymphocytotic cattle, and beneficial effects of insect vector control. **Veterinary Record**. v. 173. n. 21. p. 527. 2013.

PANEI C.J.; TAKESHIMA S.; OMORI T.; NUNOYA T.; DAV.; ISHIZAKI H. *et al.* Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leucosis using BLV CoCoMo-qPCR. **BMC Veterinary Research**. v. 9. p. 95. 2013.

SEN H.; AKSLEN L.A.; FLUGE O.; PERGAMENSCHIKOV A.; WILLIAMS C.; ZHU S.X.; E L.P.; BØRRESEN-DALE A.L.; BROWN P.O. BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumors. **Nature**. n. 406. p.747-752. 2000.

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

POLAT M.; TAKESHIMA S.; AIDA Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Journal of Virology**. n. 14. p. 209. 2017.

POLAT M. *et al.* A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. **Retrovirology** v. 13. p. 4. 2016.

POLYAK K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**. n.117. p. 3155– 3163. 2007.

ROBINSON M.S.; BONIFACINO J.S. Adaptor-related proteins. **Current Opinion in Cell Biology**. n. 4. p. 444–53. 2001.

RODRÍGUEZ S.M.; FLORINS A.; GILLET N.; BROGNIEZ A.; SÁNCHEZ A.M.T.; BOXUS M. *et al.* Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. **Viruses**. n. 3. p. 1210–48. 2011.

ROSEWICK N.; MOMONT M.; DURKIN K.; TAKEDA H.; CAIMENT F.; CLEUTER Y.; VERNIN C.; MORTREUX F.; WATTEL E.; BURNY A.; GEORGES M.; VAN DEN BROEKE A. Deep sequencing reveals abundant noncanonical retroviral microRNAs in B-cell leukemia/ lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. n. 110. p. 2306–2311. 2013.

SAGATA N.; YASUNAGA T.; TSUZUKU K. J.; OHISHI K.; OGAWA Y.; IKAWA Y.; Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** n. 82. p. 677-81. 1985.

SAKURAI M.; TANEDA A.; NAGOYA H.; SEKIKAWA K. Construction and functional characterization of mutants of the bovine leukaemia virus trans-activator protein p34 tax. **Journal of General Virology**. n. 72. p. 2527–2531. 1991.

Schwartz I.; Levy D. Pathobiology of bovine leukemia virus. **Veterinary Research**. n. 25. p. 521–36. 1994.

SCHWINGEL S.; ANDREOLLA A.P.; ERPEN L.M.S.; FRANDOLOSO R.; KREUTZ L.C. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. **Scientific Report**. n. 9. p. 2949. 2019.

SØRLIE T.; PEROU C.M.; TIBSHIRANI R.; GEISLER S.; JOHNSEN H.; HASTIE T.; EISEN M.B.; VAN DE RIJN M.; JEFFREY S.S.; THORSEN T.; QUIST H.; MATESE J.C.; BROWN P.O.; BOTSTEIN D.; LONNING P.E.; BORRESEN D.A.L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** n. 98. p. 10869-10874. 2001.

SUZUKI T.; MATSUBARA Y.; KITANI H.; IKED H. Evaluation of the d subunit of bovine adaptor protein complex 3 as a receptor for bovine leukaemia virus. **Journal of General Virology**. n. 84. p. 1309–16. 2003.

TAJIMA S.; TAKAHASHI M.; TAKESHIMA S.N.; KONNAI S. YIN S.A.; WATARAI S.; TANAKA Y.; ONUMA M.; OKADA K.; AIDA Y. A mutant form of the tax protein of bovine leukemia virus (BLV), with enhanced transactivation activity, increases expression and propagation of BLV in vitro but not in vivo. **Journal of Virology**. n. 77. p. 1894–903. 2003.

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

TAJIMA S.; AIDA Y. Mutant tax protein from bovine leukemia virus with enhanced ability to activate the expression of c-fos. **Journal of Virology**. n. 76. p. 255-62. 2002.

TAKAHASHI M.; TAJIMA S.; OKADA K.; DAVIS W.C.; AIDA Y. Involvement of bovine leukemia virus in induction and inhibition of apoptosis. **Microbes Infections**. n. 7. p. 19–28. 2005.

TAKAHASHI M.; TAJIMA S.; TAKESHIMA S.N.; KONNAI S.; YIN S.A.; OKADA K.; DAVIS W.C.; AIDA Y. Ex vivo survival of peripheral blood mononuclear cells in sheep induced by bovine leukemia virus (BLV) mainly occurs in CD5- B cells that express BLV. **Microbes Infections**. n. 6. p. 584–95. 2004.

TWIZERE J.C.; KRUYVS V.; LEFÈBVRE L.; VANDERPLAS S.A.; COLLETTE D.; DEBACQ C.; LAI W.S.; JAUNIAUX J.C.; BERNSTEIN L.R.; SEMMES O.J. *et al.*

Interaction of retroviral tax oncoproteins with tristetraprolin and regulation of tumor necrosis factor- α expression. **Journal of the National Cancer Institute**. n. 95.p. 1846–1859. 2003.

VANLEEUVEN J.A.; KEEFE G.P.; TREMBLAY.R.; POWER C.; WICHTEL J.J.
Seroprevalence of infection with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhoea virus in maritime Canada dairy cattle. **Canadian Journal of Veterinary Research**.. n. 42. p. 193–8. 2001.

WILLEMS L.; GRIMONPONT C.; HEREMANS H.; REBEYROTTE N.; CHEN G.; PORTETELLE D.; BURNY A.; KETTMANN R. Mutations in the bovine leukemia-virus tax protein can abrogate the long terminal repeat-directed Transactivating activity without concomitant loss of transforming potential. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. n. 89. p. 3957–61. 1992.

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

WILLEMS L.; HEREMANS H.; CHEN G.; PORTETELLE D.; BILLIAU A.; BURNY A.; KETTMANN R. Cooperation between bovine leukaemia virus transactivator protein and haras oncogene product in cellular transformation. **THE EMBO J**. n. 9. p. 1577–81. 1990.

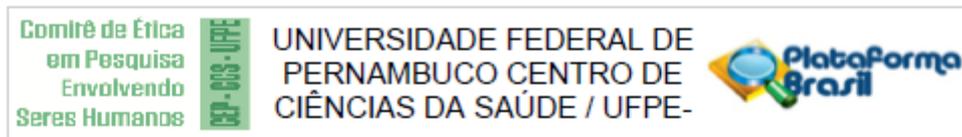
WILLEMS L.; GRIMONPONT C.; KERKHOF P.; CAPIAU C.; GHEYSEN D.; CONRATH K.; ROUSSEF R.; MAMOUN R.; PORTETELLE D.; BURNY A. *et al.*
Phosphorylation of bovine leukemia virus Tax protein is required for in vitro transformation but not for transactivation. **Oncogene**. n. 16. p. 2165–2176. 1998.

YIANNAKOPOULOU E. Etiology of familial breast cancer with undetected BRCA1 and BRCA2 mutations: clinical implications. **Cellular Oncology**. n. 37. p. 1–8. 2014.

YU C.; WANG X.; ZHOU Y.; WANG Y.; ZHANG X.; ZHENG Y. Genotyping bovine leukemia virus in dairy cattle of Heilongjiang, northeastern China. **BMC Veterinary Research**. n. 15. p. 179. 2019.

ZHANG R.; JIANG J.; SUN W.; ZHANG J.; HUANG K.; GU X.; WANG C. Lack of Association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients. **Breast Cancer Research**. n. 18. p. 101. 2016.

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA PATOGÊNESE MAMÁRIA, SUA ASSOCIAÇÃO COM O HPV E IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS POTENCIAIS BIOMARCADORES NO DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DAS LESÕES

Pesquisador: Jacinto da Costa Silva Neto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 28508614.9.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 645.585

Data da Relatoria: 19/05/2014

Apresentação do Projeto:

Indicado na relatoria inicial.

Objetivo da Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Indicado na relatoria inicial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Indicado na relatoria inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

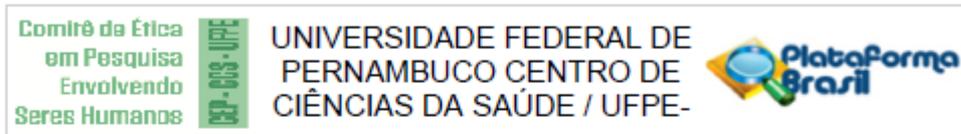
Indicado na relatoria inicial.

Recomendações:

S/recomendação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.



Continuação do Parecer: 645.585

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão e o pesquisador está autorizado para iniciar a coleta de dados.

Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, após a entrega do relatório final, na PLATAFORMA BRASIL, através de "Notificação" e, após apreciação, será emitido Parecer Consubstanciado.

RECIFE, 13 de Maio de 2014

Assinado por:
GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
(Coordenador)