



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR / CCEN



DETECÇÃO DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (BLV) EM
CARCINOMA MAMÁRIO NO ESTADO DA PARAÍBA

IGOR CORDEIRO FERNANDES

JOÃO PESSOA - PB

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR / CCEN

**DETECÇÃO DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA EM CARCINOMA
MAMÁRIO NO ESTADO DA PARAÍBA**

IGOR CORDEIRO FERNANDES

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Pavla Almeida Diniz
Gurgel

JOÃO PESSOA - PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F363d Fernandes, Igor Cordeiro.

Detecção do vírus da leucose bovina (BLV) em carcinoma mamário no estado da Paraíba / Igor Cordeiro Fernandes. - João Pessoa, 2023.

53 f. : il.

Orientação: Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Câncer de mama. 2. Vírus - Leucose bovina. 3. Retrovírus carcinogênico. I. Gurgel, Ana Pavla Almeida Diniz. II. Título.

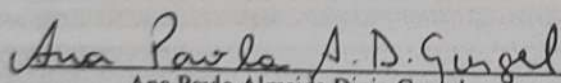
UFPB/BC

CDU 618.19-006(043)



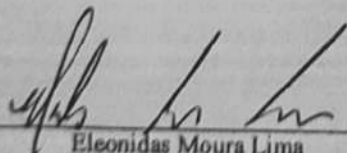
Ata da Sessão Pública da Defesa de Dissertação de Mestrado
do discente **Igor Cordeiro Fernandes**, candidato ao Título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular - Área de
Concentração em Biologia Celular e Molecular.

1 Aos trinta e um dias do mês de março de dois mil e vinte e três, às quatorze horas, reuniram-
2 se, no ambiente virtual, os membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores
3 Doutores: Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel (Orientador / Presidente), Eleonidas Moura Lima
4 (Examinador interno) e Maria Angélica Ramos da Silva (Examinador externo) constituída
5 para examinar o candidato **Igor Cordeiro Fernandes** ao grau de Mestre em Biologia Celular
6 e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular. Iniciando a sessão, na
7 qualidade de Presidente, a Professora Doutora Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel comunicou
8 aos presentes a finalidade da reunião. A seguir, concedeu a palavra para que o candidato
9 fizesse, oralmente, a exposição do trabalho intitulado "*DETECÇÃO DO VÍRUS DA*
10 *LEUCOSE BOVINA (BLV) EM CARCINOMA MAMÁRIO NO ESTADO DA PARAÍBA*".
11 Concluída a exposição, o candidato foi arguido pela Banca Examinadora, que avaliou, julgou
12 e proferiu o seguinte parecer: "**aprovado**". Ao final da sessão, a orientadora preencheu a
13 Ficha de Avaliação e emitiu o Relatório Final, para serem encaminhados ao Colegiado deste
14 Programa para homologação. E, para constar, eu, Maria do Socorro de Oliveira Souza,
15 Assistente em Administração, lavrei a presente ata, que assino junto com os membros da
16 Banca Examinadora.



Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel
Orientador / Presidente

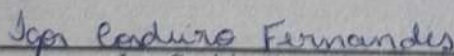
Coorientador



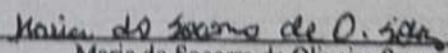
Eleonidas Moura Lima
Examinador Interno



Maria Angélica Ramos da Silva
Examinador Externo



Igor Cordeiro Fernandes
Discente



Maria do Socorro de Oliveira Souza
Assistente em Administração

RESUMO

O câncer de mama é uma doença heterogênea e multifatorial, nos quais os fatores genéticos e ambientais estão envolvidos. Dentre os fatores ambientais, as infecções persistentes causadas por oncovírus tem sido relacionadas à tumorigênese e agressividade tumoral nos tumores de mama. Estudos tem demonstrado a presença do genoma do Vírus da Leucose Bovina (BLV) em amostras de carcinoma mamário de humanos. Apesar da importância, não existe nenhum estudo de detecção do BLV em tumores mamários de pacientes do Estado da Paraíba. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi realizar a detecção do BLV em amostras de carcinoma mamário humano de pacientes do Estado da Paraíba, Nordeste do Brasil. A pesquisa do BLV foi realizada em 189 amostras parafinadas de carcinoma mamário, incluindo os subtipos luminal A, luminal B, HER-2, triplo negativo (TBNC) e super-HER-2. Para a detecção do genoma viral, foram utilizadas as técnicas de *Polimerase Chain Reaction* (PCR), *Real Time Quantitative Polimerase Chain Reaction* (qPCR), *Nested PCR* e *Auto-Nested PCR*. Os resultados do presente estudo não mostraram a presença do DNA do BLV em nenhuma amostra de carcinoma mamário. Dessa forma, não existe relação entre a presença de BLV e o carcinoma mamário na população paraibana estudada. Contudo, estudos adicionais com um maior número de amostras e utilizando outras estratégias de detecção do genoma viral poderão esclarecer o papel desse vírus na carcinogênese mamária.

Palavras-chave: Câncer de mama humano; Vírus da Leucose Bovina (BLV); retrovírus carcinogênico.

ABSTRACT

Breast cancer is a heterogeneous and multifactorial disease, in which genetic and environmental factors are involved. Among environmental factors, persistent infections caused by oncoviruses have been related to tumorigenesis and tumor aggressiveness in breast tumors. Studies have demonstrated the presence of the Bovine Leukosis Virus (BLV) genome in samples of human mammary carcinoma. Despite its importance, there is no study of the detection of BLV in breast tumors of patients in the State of Paraíba. Thus, this study aimed to perform the detection of BLV in samples of human breast carcinoma from patients in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. BLV screening was performed on 189 paraffin-embedded breast carcinoma samples, including luminal A, luminal B, HER-2, triple negative (TBNB), and super-HER-2 subtypes. For the detection of the viral genome, the techniques of Polymerase Chain Reaction (PCR), Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR), Nested PCR, and Auto-Nested PCR were used. The results of the present study did not show the presence of BLV DNA in any sample of breast carcinoma. Thus, there is no relationship between the presence of BLV and breast carcinoma in the population studied in Paraíba. However, additional studies with a larger number of samples and using other viral genome detection strategies may clarify the role of this virus in mammary carcinogenesis.

Keywords: Bovine Leukemia Virus (BLV); human breast cancer; carcinogenic retrovirus.

LISTA DE ABREVIATURAS

BLV – Vírus da Leucose Bovina
EBL – Leucose Bovina Enzoótica
ELISA – Ensaio Imunoenzimático
env – Envelope
HER2 – Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HPV – Papilomavírus Humano
HTLV – 1 - Vírus Linfotrópico T Humano tipo 1
IDGA – Imunodifusão em Gel de Ágar
INCA – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
LP – Linfocitose Persistente
LTR – Long Terminal Repeats
OIE – Organização Mundial de Saúde Animal
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCR – *Polimerase Chain Reaction*
pol – Polimerase
qPCR – *Real Time Quantitative Polimerase Chain Reaction*
RE – Receptores Hormonais de Estrogênio
RP – Receptores Hormonais de Progesterona
SBL – Leucose Bovina Esporádica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dois tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 em mulheres, exceto pele não melanoma	15
Figura 2 – Taxas de mortalidade por câncer de mama, padronizadas por idade, sexo feminino, segundo Regiões do Brasil, de 1980 a 2016	16
Figura 3 – Representação esquemática da estrutura do genoma do BLV.....	20
Figura 4 – Representação da partícula viral BLV.....	20
Figura 5 – Ciclo de replicação dos retrovírus	22
Figura 6 – Curva de melting de uma PCR convencional, usando o primer Tax (113pb).....	38
Figura 7 – Resultado de uma das PCRs usando o <i>primer</i> Tax (113pb).....	38
Figura 8: Resultado de uma das RT-PCR usando o primer Gag (272pb).....	39
Figura 9: Resultado de uma das <i>Auto Nested</i> PCR usando o primer Gag (272pb) e Tax (113pb)	40
Figura 10: Resultado de uma das <i>Nested</i> PCR usando os <i>primers</i> Tax (373pb) e Tax (113pb)	40
Figura 11: Resultado de uma das eletroforeses em gel de agarose a 1%	41

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1 – Classificação molecular do câncer de mama, baseada em imuno-histoquímica...	17
Quadro 1 – Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a detecção do DNA do BLV	27
Tabela 2 – Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (113 pb) por PCR convencional	28
Tabela 3 – Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Gag (273 pb) por PCR convencional	28
Tabela 4 – Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (113 pb) por Auto-Nested PCR	29
Tabela 5 – Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (372/113 pb) por Nested PCR	30
Tabela 6 – Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (372pb) por Auto-Nested PCR	31
Tabela 7 – Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Gag (272pb) por Auto-Nested PCR	32
Tabela 8 – Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (113pb) por RT PCR	32
Tabela 9 – Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Gag (272pb) por RT PCR	33
Tabela 10 – Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (113pb) por Nested RT-PCR	33
Tabela 11 – Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Gag (272pb) por Nested RT-PCR	33
Tabela 12 – Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (273pb) por Nested RT-PCR	34
Tabela 13 – Caracterização das amostras de CM em relação a idade, localização anatômica, grau histológico, classificação histopatológica, classificação molecular, índice mitótico, grau de pleomorfismo nuclear, diferenciação tubular, grau histopatológico, invasão angiolinfática e expressão da proteína Ki-67	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 O Câncer de Mama.....	15
3.1.1 Incidência e mortalidade.....	15
3.1.2 Classificações do câncer de mama.....	16
3.1.3 Fatores de risco.....	17
3.2 O vírus da Leucose Bovina	18
3.2.1 Breve histórico.....	18
3.2.2 Genoma e estrutura retroviral.....	19
3.2.3 Replicação viral.....	21
3.2.4 Transmissão.....	23
3.2.5 Detecção.....	23
3.2.6 Potencial zoonótico.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Coleta de amostras e dados clínicos.....	26
4.2 Aspectos éticos.....	26
4.3 Análises moleculares: Extração de DNA genômico e detecção do BLV.....	26
4.4 Detecção do DNA viral	27
5 RESULTADOS	35
5.1 Caracterização das amostras	35
5.2 Detecção do genoma do BLV	36
5.2.1 Detecção pela PCR convencional	37
5.2.2 Detecção pela qPCR	38
5.2.3 Detecção pela <i>Nested</i> PCR	39
5.2.4 Eletroforese	39
6 DISCUSSÃO	41
7 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS.....	43
APÊNDICE A	42

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é considerado uma doença crônica, não transmissível e multifatorial que afeta milhões de mulheres em todo o mundo. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de mama é o tipo de neoplasia mais prevalente no mundo. Em 2020, foram registrados mais de 2,26 milhões de novos casos e cerca de 685 mil mortes (FERLAY *et al.*, 2020). Particularmente no Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) caracterizam o câncer de mama como o segundo mais incidente com mais de 66 mil casos, além de 18.032 óbitos no ano de 2020 (INCA, 2019a; INCA, 2022).

Estudos sugerem que o câncer de mama é uma doença em constante transformação, de comportamento dinâmico e heterogênea a nível molecular. Segundo a OMS, o carcinoma mamário abrange 19 subtipos diferentes. Além disso, o câncer de mama não possui uma única causa e engloba riscos relacionados a fatores ambientais e comportamentais, bem como fatores da história reprodutiva e hormonal, além de fatores genéticos e hereditários (BRAY *et al.* 2018; FERLAY *et al.*, 2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019a; HARBECK; PENAULT-LLORCA e CORTES 2019; INCA, 2019a).

A relação entre células cancerígenas e vírus não é conhecida e bem documentada. Atualmente vários tipos de cânceres humano estão relacionados a infecções virais (SCHWINGEL *et al.*, 2019). Martel *et al.* (2019) estimaram que 2,2 milhões de novos casos em 2018 são atribuíveis às infecções, relacionando 36,3% ao *Helicobacter pylori*, 31,1% ao Papilomavírus humano (HPV), 16,3% e 7,1% aos vírus das hepatites B e C, respectivamente. Na maioria dos casos, a infecção viral é necessária, mas não o suficiente para o desenvolvimento do tumor. Outros fatores possivelmente influenciam na tumorigênese, visto que os vírus causam câncer apenas em uma pequena porcentagem de indivíduos (SARID e GAO, 2011; CUESTA, 2018).

A busca por novos agentes infecciosos, aos quais apresentam ligação com o câncer de mama é amplamente estudada. Entre eles, o Vírus da Leucose Bovina (BLV) já foi detectado em amostras humanas de carcinoma mamário (NIKBAKHT *et al.*, 2010; GIOVANNA *et al.*, 2013; BUEHRING *et al.*, 2014; BUEHRING *et al.*, 2015; BUEHRING *et al.*, 2017; LAWSON e GLENN, 2017; BALTZELL *et al.*, 2018; LENDEZ *et al.*, 2018; SCHWINGEL *et al.*, 2019), sugerindo assim, um possível papel do BLV no desenvolvimento e/ou progressão do câncer de mama.

O BLV pertence à família Retroviridae, ao gênero Deltaretrovírus e está intimamente relacionado ao vírus linfotrófico T humano tipo 1 (HTLV-1). Esse δ -retrovírus é o agente causador de leucemia em bovinos de corte e de leite. As partículas do vírus variam de 90 a 120 nm e possuem regiões típicas do genoma retroviral: LTR (região promotora), gag (antígeno específico do grupo, região do capsídeo), pol (polimerase, região de transcrição reversa) e env (envelope). Entretanto, o BLV apresenta uma região adicional diferente de outros retrovírus oncogênicos: a Tax, que possui funções reguladoras inibindo o reparo do DNA e causando interrupção dos mecanismos de controle do crescimento celular. Além das proteínas estruturais e reguladoras, o BLV também expressa microRNAs reguladores (MILLER *et al.*, 1969; AIDA *et al.*, 2013; LAWSON; SALMONS e GLENN, 2018).

Sabe-se também que a principal célula alvo desse vírus em bovinos é o linfócito B (MIRSKY, OLMSTEAD e LEWIN, 1996). No entanto, outras células como monócitos, macrófagos e linfócitos T também podem ser infectadas (PANEI *et al.*, 2013). A maioria dos animais infectados é assintomática e não sofre alterações na contagem de linfócitos podendo ser encontrados células contaminadas no sangue e no leite de vacas sub-clinicamente infectadas (SCHWARTZ e LEVI, 1994). A identificação dos animais infectados ocorre quando detectada a presença de anticorpos anti-BLV ou medindo a carga pró-viral em amostras de sangue (GILLET *et al.*, 2007).

A infecção por BLV em rebanhos bovinos é relatada em todo o mundo e a transmissão requer a transferência de células de indivíduos infectados para não-infectados, pois as partículas livres de BLV são instáveis e não são eficientes no processo de infecção (HOPKINS e GIACOMO, 1997; BARTLETT *et al.*, 2014; LAWSON; SALMONS e GLENN, 2018). Além disso, a principal via de transmissão entre os animais é iatrogênica, especialmente pelo uso de agulhas contaminadas, descorna e palpação transretal (HOPKINS e GIACOMO, 1997).

A maioria das regiões europeias implementou um programa de erradicação eficiente, contudo, a prevalência de BLV permanece alta em todo o mundo. Cabe ressaltar que no Brasil não há um programa de controle específico para essa erradicação. No estado da Paraíba, ocorre a circulação do vírus, sendo demonstrada uma alta soroprevalência de rebanhos bovinos (23,4%) e de animais da pecuária (10,8%) (MARAWAN *et al.*, 2021; RAMALHO *et al.*, 2021).

A forma como o BLV é transmitido para os humanos ainda apresenta muitas lacunas. Sabe-se que as principais fontes do vírus são o leite e o sangue de animais infectados (MEKATA *et al.*, 2018). Nesse cenário, Olaya-Galan *et al.*, (2017) detectaram a presença do

DNA viral em carne e leite bovino crus para consumo humano, dessa forma, o consumo desses alimentos apresenta-se como uma possível hipótese à transmissão de BLV para humanos (LAWSON e GLENN, 2017).

Diante desse contexto e sabendo que o câncer de mama é um grave problema de saúde pública no Brasil e o BLV é generalizado no gado brasileiro, a detecção do vírus em tecido mamário humano é importante como passo inicial para contribuir no entendimento dessa infecção viral como possível fator de risco para desenvolvimento e/ou progressão do câncer.

Na Paraíba, o consumo de produtos de origem bovina sem o processamento adequado de desinfecção é frequente. Em razão disso, motivou-se o estudo com amostras de pacientes com câncer de mama na Paraíba a fim de identificar a positividade do BLV para compreender a possibilidade de associação entre a presença viral e o carcinoma mamário. Este documento disserta sobre o tema a partir da investigação de 189 amostras teciduais e busca detecção do vírus, contribuindo assim, com um melhor entendimento entre essa associação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar do Vírus da Leucose Bovina (BLV) em amostras de biópsias de tecido mamário com diagnóstico de carcinoma mamário no estado da Paraíba.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar DNA do BLV a partir do DNA extraído de amostras parafinadas de carcinoma mamário, incluindo os subtipos luminal A, luminal B, HER-2, triplo negativo e super-Her-2;
- Realizar uma análise de associação entre a frequência do BLV aos diagnósticos histológicos dos pacientes.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

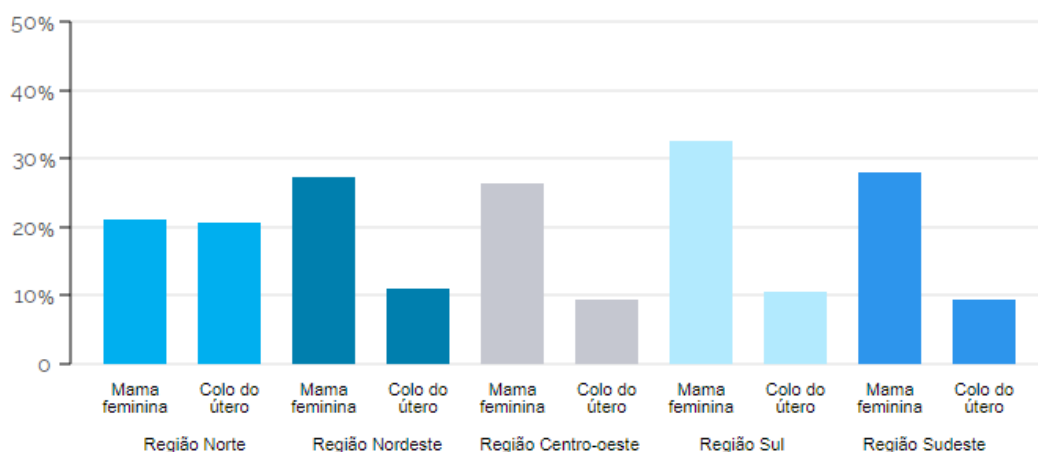
3.1 O Câncer de Mama

3.1.1 Incidência e mortalidade

O câncer de mama constitui um grave problema de saúde pública em todo o mundo, sendo apontado, em mulheres, como o câncer de maior incidência em 157 países e o de maior número de mortes em 119 países no ano de 2019 (GLOBAL BURDEN OF DISEASE, 2019). Dados da OMS estimam que a incidência mundial de câncer de mama passará de 2.261.419 novos casos em 2020 para 2.666.412 em 2030, representando um aumento de aproximadamente 18%, ao passo que a incidência brasileira aumentará cerca de 25% entre 2020 e 2030 (FERLAY *et al.*, 2020).

Estimativas do INCA para 2020 apresentaram o câncer de mama feminina como uma das maiores taxas de incidência ajustadas por idade, nas cinco Regiões do Brasil. Quando comparado ao segundo câncer mais frequente - o de colo do útero - a sua magnitude é cerca de duas a três vezes maior, exceto no Norte, local em que a incidência de ambas as doenças é semelhante (Figura 1). (INCA 2019a).

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dois tipos de câncer mais incidentes estimados 2020 em mulheres, exceto pele não melanoma.

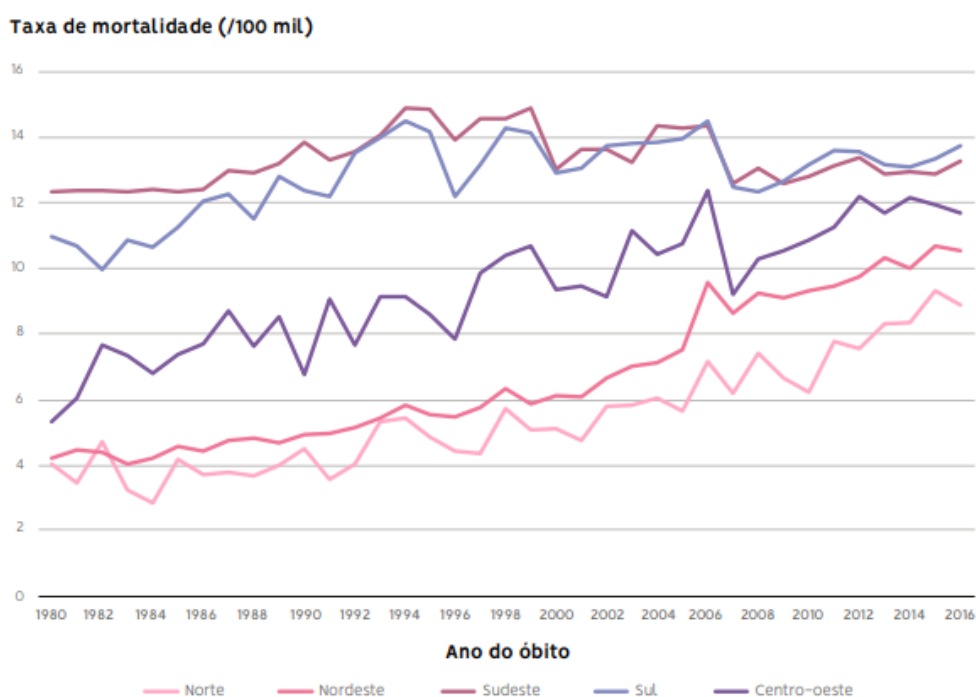


Fonte: Adaptado de INCA (2019a).

As Taxas padronizadas de mortalidade por câncer de mama indicam um aumento de 33,6% no Brasil e pode ser constatado em todas as Regiões do país, embora com diferentes magnitudes, segundo dados de 1980 a 2016. Sul e Sudeste possuem as maiores taxas de

mortalidade do Brasil, enquanto Norte e Nordeste apresentam os valores mais baixos durante o tempo de observação. No início do período, o Centro-Oeste apresentava as taxas semelhantes às do Norte e do Nordeste, entretanto, aproxima-se da magnitude das taxas das Regiões Sul e Sudeste com o passar dos anos (Figura 2) (INCA, 2019c).

Figura 2: Taxas de mortalidade por câncer de mama, padronizadas por idade, sexo feminino, segundo Regiões do Brasil, de 1980 a 2016.



Fonte: INCA (2019c)

3.1.2 Classificações do câncer de mama

Inicialmente, o câncer de mama foi referido como uma única doença, entretanto, atualmente, essa enfermidade é considerada um grupo de doenças, composto por quatro subtipos moleculares principais e pelo menos 19 subtipos histológicos. Devido a essa diversidade, a doença pode se desenvolver mais lentamente ou de forma mais acelerada, bem como apresentar diferentes respostas ao tratamento e resultados distintos. Essa variedade de comportamento está relacionada às características próprias de cada tumor (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; HARBECK; PENAULT-LLORCA e CORTES, 2019; INCA, 2019b).

Para o tipo histológico, a maioria (81%) dos cânceres de mama são invasivos ou infiltrativos, ou seja, as células anormais rompem as paredes dos ductos ou lóbulos onde se

originaram e invadem o tecido mamário circundante. Além disso, o carcinoma invasivo de tipo não especial constitui mais de 70% dos cânceres mamários, indicando que a tipagem histológica representa uma categorização ampla em vez de uma classificação detalhada (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; TSANG e TSE, 2020)

A heterogeneidade do câncer de mama ficou mais evidente com o uso das tecnologias de alto rendimento, fornecendo dados a nível molecular, entretanto, a aplicação na prática clínica é limitada devido ao custo e as complexidades técnicas para sua realização. A classificação molecular baseada em imunohistoquímica para avaliação de marcadores biológicos tem sido utilizada como substituta ao uso dessas tecnologias. Nessa classificação são avaliadas as expressões dos receptores hormonais de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), o índice proliferativo celular (KI-67) e a superexpressão do gene do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) para a classificação dos subtipos (Tabela 1): (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019 TSANG e TSE, 2020).

Tabela 1 – Classificação molecular do câncer de mama, baseada em imuno-histoquímica.

Subtipos	Receptores			
	RE	RP	HER2	Ki67
<i>Luminal A-like</i>	+	≥20%	-	< 20%
<i>Luminal B-like</i>	+	< 20%*	++	≥ 20%*
HER2-overexpression	-	-	+	
<i>Basal-like</i>	-	-	-	

Fonte: Adaptado de Tsang e Tse (2020).

Legenda: * RP < 20% e/ou HER2+ e/ou Ki67 ≥ 20%

3.1.3 Fatores de risco do câncer de mama

Existem diversos fatores que contribuem para o aumento do risco de desenvolver a doença, como os ambientais e comportamentais, bem como os da história reprodutiva e hormonal, além dos genéticos e hereditários, entretanto considera-se a idade superior aos 50 anos o fator mais importante (BRAY *et al.* 2018; FERLAY *et al.*, 2018; INCA 2019b).

Alguns vírus afetam vários eventos celulares e contribuem para o estabelecimento de malignidades humanas podendo estar associados ao desenvolvimento neoplásico. Os vírus oncogênicos constituem uma das causas mais importantes de câncer no mundo. Cerca de 2,2

milhões de novos casos de câncer em 2018 foram atribuídos a infecções, apresentando o Papilomavírus humano (HPV) com 31,1%, os vírus das hepatites B com 16,3% e da hepatite C com 7,1%. Entretanto, deve-se observar que outros fatores possivelmente influenciam na carcinogênese, uma vez que na maioria dos casos, a infecção viral é necessária, mas não o suficiente para o desenvolvimento do tumor (SARID e GAO, 2011; CUESTA, 2018; MARTEL *et al.*, 2019; MIRZAEI *et al.*, 2020).

Várias pesquisas foram realizadas buscando novos agentes infecciosos que apresentam ligação com o câncer de mama. Por conseguinte, foi detectado o DNA do Vírus da Leucose Bovina (BLV) em amostras humanas de carcinoma mamário sinalizando assim, um possível papel do vírus na etiopatogenia da doença (NIKBAKHT *et al.*, 2010; GIOVANNA *et al.*, 2013; BUEHRING *et al.*, 2014; BUEHRING *et al.*, 2015; BUEHRING *et al.*, 2017; LAWSON e GLENN, 2017; BALTZELL *et al.*, 2018; LENDEZ *et al.*, 2018; SCHWINGEL *et al.*, 2019).

3.2 O Vírus da Leucose Enzoótica Bovina

3.2.1 Breve histórico

A Leucose Enzoótica Bovina (EBL) é a doença neoplásica mais importante em bovinos (MARAWAN *et al.*, 2021). A EBL foi relatada pela primeira vez em 1871 por Leisering, ao observar a presença de nódulos levemente amarelos no baço aumentado de bovinos, e a doença foi considerada endêmica no século XX em vários países europeus, notadamente na Dinamarca e na Alemanha (LEISERING, 1871 apud AIDA *et al.*, 2013; SCHWARTZ e LEVY, 1994).

Uma das manifestações clínicas mais importantes da doença é a ruptura do baço consecutiva à formação do tumor. A leucose bovina é classificada em dois tipos: o primeiro, Leucose Bovina Esporádica (SBL), é caracterizado por infectar células T; o segundo, Leucose Bovina Enzoótica (EBL), se caracteriza pela infecção de células B (GILLET *et al.*, 2007). Embora suspeitada por muitos anos, a etiologia viral da EBL não foi descrita até 1969 e até hoje, o agente etiológico da SBL ainda é desconhecido (THEILEN e DUNGWORTH, 1965; ONUMA *et al.*, 1979; GILLET *et al.*, 2007 LAIRMORE, 2014).

Por se tratar de um câncer do tecido linfoide, os termos “linfoma maligno” e “linfossarcoma” são utilizados na descrição da patologia. Segundo Miller e Van Der Maaten, (1982) e Straub, (1984), a doença também foi nomeada de leucemia bovina, mas esse termo

não é patologicamente correto, visto que leucemia é apenas um dos sinais clínicos que podem ser causados pelo BLV, dessa forma, o termo leucose tem sido adotado (apud BRAGA *et al.*, 1998).

Ferrer e Piper (1981) e Ferrer (1982a) ressaltam que todo bovino ao ser infectado com o vírus desenvolve anticorpos, ainda que os sinais clínicos ou patológicos da doença não estejam presentes em todos os animais contaminados (apud BRAGA *et al.*, 1998). A maioria dos bovinos infectados pelo BLV é assintomática, aproximadamente entre 30 e 70% deles apresentam linfocitose persistente (LP) com vários desfechos clínicos e apenas uma pequena proporção de animais (0,1-10%) desenvolve sinais de EBL (OIE, 2018; MARAWAN *et al.*, 2021).

Os sinais clínicos podem incluir perda de peso, fraqueza ou debilidade geral, distúrbios digestivos, inapetência e às vezes manifestações neurológicas dependendo do local dos tumores. Os linfossarcomas são vistos tipicamente em animais com mais de três anos, embora os animais possam se infectar com o vírus em qualquer idade. Os linfonodos superficiais podem estar aumentados e ser palpáveis sob a pele e pelo toque retal. Na necropsia, os linfonodos e vários tecidos apresentam infiltrados de células neoplásicas. A suscetibilidade dos bovinos à LP é determinada geneticamente e talvez seja também para o desenvolvimento do tumor. (OIE, 2018).

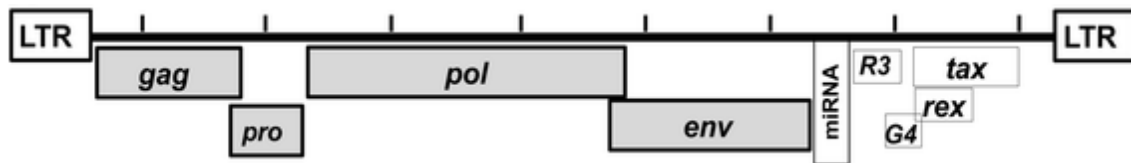
3.2.2 Genoma e estrutura retroviral

O BLV é um Deltaretrovírus da família *Retroviridae* e infecta preferencialmente linfócitos B, mas também é capaz de infectar monócitos, granulócitos, linfócitos T CD2+, T CD3+, TCD4+ e CD8+ (SCHWARTZ *et al.*, 1994; PANEI *et al.*, 2013; Okagawa *et al.*, 2018). Os hospedeiros naturais do BLV são os bovinos domésticos, os búfalos e as capivaras, embora após infecção experimental pode ser detectada uma resposta persistente de anticorpos em veados, coelhos, ratos, porquinhos-da-índia, gatos, cães, ovelhas, macacos rhesus, chimpanzés, antílopes, porcos e cabras. Além disso, as ovelhas desenvolvem tumores mais frequentemente em uma idade mais jovem do que o gado (OIE, 2018).

As partículas do vírus variam de 90 a 120 nm, com um envelope, um capsídeo icosaédrico e seu genoma completo consiste em 8.714 nucleotídeos composto por duas fitas de RNA idênticas e não complementares, de polaridade positiva (MILLER *et al.*, 1969; MURAKAMI *et al.*, 2011; AIDA *et al.*, 2013; POLAT *et al.*, 2016).

Toda informação genética do vírus é flanqueada por duas repetições terminais longas (LTR) idênticas. O vírus codifica proteínas reguladoras, como Tax e Rex, proteínas acessórias, como G4 e R3, proteínas estruturais e enzimáticas (gag, pro, pol, env), expressa microRNAs reguladores (Figura 1) e está geneticamente relacionado ao vírus da leucemia de células T humana tipo 1 (MILLER *et al.*, 1969; AIDA *et al.*, 2013; POLAT, TAKESHIMA E AIDA, 2017).

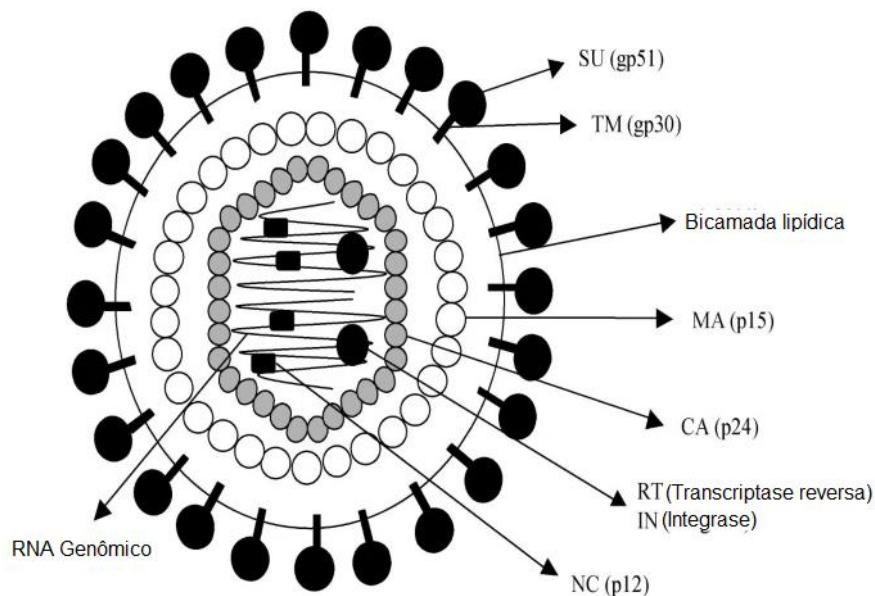
Figura 3: Representação esquemática da estrutura do genoma do BLV



Fonte: Polat, Takeshima e Aida (2017).

O gene gag é traduzido como o precursor (Pr70 gag) e processado em três proteínas maduras: a proteína da matriz, p15 (MA), a proteína do capsídeo, p24 (CA) e a proteína do nucleocapsídeo, p12 (NC) (Figura 4) que desempenham papéis estruturais importantes na montagem de vírions na membrana plasmática e no envelopamento do genoma (GILLET *et al.*, 2007; BAI *et al.*, 2019).

Figura 4: Representação da partícula viral BLV.



Fonte: Adaptado de Gillet *et al.*, (2007).

Os genes pro e pol codificam as proteases (Pro) p14, contendo a transcriptase reversa (RT), e p80, contendo a integrase (IN) (Figura 4) (GILLET e WILLEMS, 2016).

O gene *pX*, localizado entre a sequência *env* e a 3' *LTR*, codifica pelo menos quatro proteínas, incluindo as proteínas reguladoras tax e rex, e as proteínas acessórias R3 e G4. A proteína Tax tem sido extensivamente estudada, sendo associada à leucemogênese induzida pelo BLV. A proteína Rex é responsável pela exportação nuclear do RNA viral e promove acumulação citoplasmática e tradução de RNA mensageiro viral em células infectadas (GILLET *et al.*, 2007; AIDA *et al.*, 2013; BAREZ *et al.*, 2015; POLAT *et al.*, 2016).

O gene *env* codifica uma glicoproteína de superfície madura (gp51) e uma glicoproteína transmembrana (gp30) (Figura 4), e há evidências sugestivas que ela provavelmente contém o domínio de ligação ao receptor e está envolvido diretamente na infectividade viral, embora o receptor celular real para a infecção por BLV não foi identificado (JOHNSTON e RADKE, 2000; BAI *et al.*, 2019).

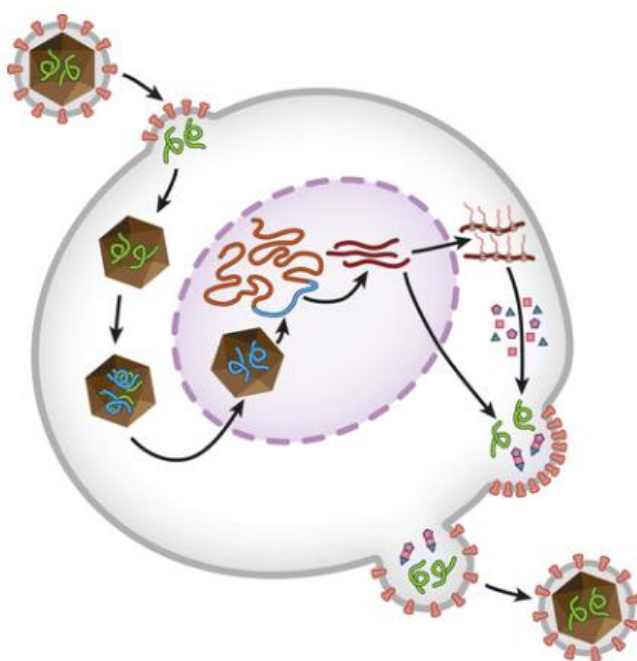
3.2.3 Replicação viral

A glicoproteína *env* gp51 é necessária para infecção pelo BLV, é por meio da gp51 que ocorre a ligação seletiva ao receptor da célula susceptível. (BAN *et al.*, 1993). No gp51 são encontrados oito epítomos, sendo destes, quatro lineares e três conformacionais. A região C-terminal possui os epítomos lineares A, B, D e E. Já na região N-terminal estão presentes os três epítomos conformacionais F, G e H que são alvos dos anticorpos produzidos pelo hospedeiro, sendo a glicosilação dessa glicoproteína importante para o reconhecimento viral (JOHNSTON E RADKE, 2000; CAMARGOS; REIS e LEITE, 2004; DE BROGNIEZ; MAST e WILLEMS, 2016).

Após o reconhecimento viral a gp51 induz uma alteração conformacional iniciando, assim, o processo de fusão pela proteína transmembrana gp30. Posteriormente, é exposto um peptídeo de fusão na extremidade amino-terminal da gp30 formando uma abertura na bicamada lipídica e liberando o nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira. Com o RNA viral exposto, um DNA de fita dupla é então sintetizado utilizando a transcriptase reversa viral. Este DNA dupla fita, chamado pró-vírus ou DNA pró-viral, é direcionado para núcleo e integra-se ao genoma da célula hospedeira pela ação da enzima integrase. Após a integração, o provírus utiliza da maquinaria de transcrição e tradução da célula do hospedeiro sintetizando mRNAs e, posteriormente, produzindo as proteínas virais. Na sequência, são montados os nucleocapsídeos no citoplasma e a proteína precursora gag impulsiona os

processos de transporte e exocitose dessas partículas sem provocar lise celular, adquirindo o envelope lipoproteico. A finalização do ciclo ocorre já no meio extracelular por meio da ação de proteases, com a maturação das partículas produzindo novos vírions infecciosos (Figura 5). (CAMARGOS; REIS e LEITE, 2004; RAVAZZOLLO e COSTA, 2007; DE BROGNIEZ; MAST e WILLEMS, 2016).

Figura 5: Ciclo de replicação dos retrovírus



Fonte: Lairmore (2014).

O BLV não se integra preferencialmente em regiões transcricionalmente ativas durante todos os estágios clínicos da doença. Embora os sítios de integração do BLV possam não estar associados à progressão da doença, a integração é seletiva no nível de nucleotídeos o pró-vírus favorece a integração em regiões desvantajosas para a expressão do gene viral. Foi descrito que a inserção de ácido nucléico de BLV ocorre com maior frequência na região de retroelementos e na região intrônica. Isso pode estar relacionado à supressão da expressão viral de modo a escapar do sistema imune do hospedeiro, no entanto não há local específico para integração do genoma viral (MURAKAMI *et al.*, 2011; T. Miyasaka, Oguma e Sensui, 2015; OHNUKI *et al.*, 2021).

Adicionalmente, o BLV ainda pode causar supressão imunológica em animais afetados por meio de determinados mecanismos, incluindo a interrupção de moléculas de

sinalização de células imunes e produção de citocinas, distúrbio da proliferação e apoptose de células imunes e a possível destruição de células infectadas (FRIE e COUSSENS, 2015).

3.2.4 Transmissão

A principal via de transmissão do BLV é horizontal e ocorre pela transferência de células infectadas entre os animais. O contato com fluidos biológicos contaminados acontece principalmente por meio iatrogênico, como descorna, vacinação, palpação retal, entre outros procedimentos cirúrgicos com materiais indevidamente esterilizados ou pela reutilização de materiais descartáveis (LEUZZI JUNIOR; ALFIERI e ALFIERI, 2001; RAVAZZOLLO e COSTA, 2007; LAIRMORE, 2014). Já a transmissão vertical, *in utero*, ou através de colostro e leite, é responsável por uma proporção relativamente pequena de infecções (HOPKINS E DIGIACOMO, 1997).

Kuczewski *et al.* (2021) revisaram as rotas de transmissão confirmadas (sangue, reprodução natural, *in utero*, colostro e leite) e concluíram que ainda faltam informações detalhadas sobre outros riscos específicos de transmissão do vírus, como por exemplo, transmissão por contato e facas corta-cascos. Os autores observaram também que os animais infectados abrigam quantidades variáveis de pró-vírus em suas células e os bovinos com alta carga pró-viral parecem ser mais propensos a infectar outros. Foi observado também que há a necessidade de estudos detalhados e em larga escala investigando papéis de vias de transmissão específicas, conhecendo a carga pró-viral dos indivíduos infectados (KUCZEWSKI *et al.*, 2021).

3.2.5 Detecção do BLV

A região *env* tem sido amplamente utilizada para o desenvolvimento de testes diagnósticos, estudos de genotipagem e filogenéticos do BLV. Atualmente são descritos 12 genótipos circulantes, com base na diversidade e análise filogenética principalmente da região *env*; no entanto, outras regiões do genoma podem conter variações genéticas como LTR, gag, pro, pol, tax, rex, R3, G4 e regiões codificadoras de micro-RNAs (RNA-mi) (POLAT *et al.*, 2016; PLUTA *et al.*, 2018; SULTANOV *et al.*, 2022).

A infecção com o vírus em bovinos é vitalícia e dá origem a uma resposta persistente de anticorpos. Os anticorpos podem ser detectados pela primeira vez 3 a 16 semanas após a infecção. Anticorpos de origem materna podem levar até 6 ou 7 meses para desaparecer. Não há como distinguir anticorpos transferidos passivamente daqueles resultantes de infecção ativa. A infecção ativa, no entanto, pode ser confirmada pela detecção do pró-vírus BLV pela PCR (OIE, 2018).

Os testes preconizados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) são a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA), baseados, principalmente, na detecção de anticorpos contra as proteínas p24 do capsídeo viral e gp51 do envelope, sendo os anticorpos para a gp51 detectados mais precocemente. Os ELISAs são geralmente mais sensíveis que os testes AGID (OIE, 2018).

Após a identificação é necessário o isolamento de animais positivos para controlar a disseminação do BLV e informações sobre a carga pró-viral podem ser levadas em consideração ao controlar a doença em rebanhos com alta prevalência do vírus (OIE, 2018; Kuczewski *et al.*, 2021).

Grandes perdas econômicas na pecuária, principalmente nas fazendas leiteiras, são causadas pelo BLV. Elas decorrem de custos diretos, como a diminuição da produtividade animal e da longevidade das vacas, e de custos indiretos, como as restrições impostas à importação de animais e produtos de origem animal de áreas infectadas. O controle da doença é dificultado, pois não existe vacina eficaz contra o vírus. Portanto, a detecção e o diagnóstico precoce da doença são essenciais para diminuir os prejuízos econômicos e disseminação da doença (MARAWAN *et al.*, 2021).

3.2.6 Potencial zoonótico do VBL

A presença do vírus já foi confirmada no sangue e no leite dos animais contaminados e, embora a cocção e pasteurização consigam desativar o BLV, o consumo de produtos de animais infectados pode ocorrer sem o tratamento prévio necessário (OLAYA-GALÁN *et al.*, 2017). Acredita-se que a infecção em humanos ocorre principalmente pela ingestão desses produtos (LAWSON e GLENN, 2017).

Apesar do fato de algumas pesquisas terem revelado uma ligação entre BLV e câncer de mama, as evidências permanecem inconclusivas (MARAWAN *et al.*, 2021). A primeira indicação do impacto potencial do BLV na saúde pública surgiu apenas alguns anos após a descoberta do vírus com a pesquisa de McClure *et al.* (1974) no qual dois em cada seis

chimpanzés alimentados com leite não pasteurizado de vacas infectadas naturalmente pelo BLV desenvolveram eritroleucemia fatal. Posteriormente, Ferrer, Kenyon e Gupta (1987) sugeriram que os humanos são frequentemente expostos ao BLV por via oral devido a presença de BLV ou células infectadas por BLV no leite de vacas naturalmente infectadas.

Estudos soropidemiológicos não detectaram anticorpos anti-BLV em pessoas com níveis variados de exposição ao BLV (MARAWAN *et al.*, 2021). A falta de sequências específicas do BLV em 157 casos de leucemia linfoblástica aguda infantil ou linfoma não Hodgkin e 136 controles nos Estados Unidos (Bender *et al.*, 1988), assim como em 517 casos de leucemia humana e 162 pacientes com câncer de pulmão na Coreia do Sul (Lee *et al.*, 2005), forneceram evidências adicionais contra o envolvimento do BLV em doenças humanas.

Acrescenta-se ainda que o vírus não foi detectado no *buffy coat* do sangue de pacientes com câncer de mama nos Estados Unidos (ADEKANMBI *et al.*, 2021), nem no genoma completo utilizando sequências de tumores de mama e obtidas do banco de dados NCBI de genótipo e fenótipo (GILLET e WILLEMS, 2016), nem em amostras parafinadas da China (ZHANG *et al.*, 2016) e Japão (SAITO *et al.*, 2020).

Apesar disso, o BLV já foi detectado no sangue humano (BUEHRING *et al.*, 2019) e em amostras de câncer de mama em diferentes regiões geográficas, como Colômbia (GIOVANA *et al.*, 2013), Estados Unidos (BUEHRING *et al.*, 2015), Austrália (BUEHRING *et al.*, 2017), Brasil (SCWINGEL *et al.*, 2019) e Irã (KHALILIAN, HOSSEINER e MADADGAR, 2019). Tais estudos utilizaram diferentes métodos de detecção como a PCR convencional, *Nested* PCR e PCR *in situ*.

Existe a hipótese de que o BLV causa câncer de mama por meio da proteína Tax e outras características compartilhadas com o HTLV-1 no desenvolvimento da leucemia/linfoma de células T do adulto. Acredita-se que essa proteína influencie no comprometimento do reparo do DNA, no aumento da instabilidade genômica, na desregulação dos pontos de verificação do ciclo celular e na transcrição anormal (PHILPOTT e BUEHRING, 1999; ROSEWICK *et al.*, 2017).

Dessa forma, dada a alta prevalência do BLV em rebanhos paraibanos e o consumo de carne crua e leite não pasteurizado em muitas regiões do Estado da Paraíba, estudos de detecção e expressão gênica do BLV são necessários para esclarecer se esse agente viral está associado com os casos de câncer de mama em pacientes residentes do Nordeste do Brasil.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras e dados clínicos

O presente estudo trata-se de uma análise retrospectiva experimental e foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética (LABMEO) e no Laboratório Multiusuário, do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM/UFPB). Foram utilizadas 189 amostras de tecido parafinado com diagnóstico histopatológico de câncer de mama, coletadas entre 2016 e 2019 e expedidas pelo Laboratório de Patologia Ivan Rodrigues, em João Pessoa – PB.

Das 189 amostras de CM incluídas nesse estudo, 66 foram classificadas como Luminal A, 37 como Luminal B, 31 como HER2, 23 como TBNC, 6 como super HER2 e 19 como CM sem classificação. Todos os indivíduos desse estudo foram do sexo feminino, com a média de idade de 53,17 anos.

4.2 Aspectos éticos

O presente estudo atendeu às Resoluções nº 196/96 e 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos e armazenamento de material biológico, o presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB), para sua apreciação e foi aprovado sob o número 4.506.821.

4.3 Análises moleculares: Extração de DNA genômico e quantificação do material genético

As amostras de tecido parafinado foram submetidas à extração do DNA segundo Shi *et al.* (2002), utilizando de cinco a oito cortes histológicos com 3 µm de espessura cada. Os cortes foram transferidos para microtubos de 1,7 ml e posteriormente foram lavados com xilol aquecido para retirada da parafina do tecido. Após o processo de lavagem as amostras foram secadas e expostas a 1 ml de tampão de Extração (Tris/HCl 0,01 M; Sacarose 0,32 M; MgCl₂ 5 mM; Triton X-100 1%, KCl 50 mM, NP-40 0,45%; Tween 20 0,45%) e adicionados 5 µm de proteinases K (10 mg/ml), sendo posteriormente aquecidas à 55 °C por 3 horas.

Subsequentemente, foi adicionado 1,5 ml da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e a solução passou por inversões suaves durante aproximadamente 5

minutos para completa homogeneização. A solução homogeneizada foi centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, adicionando-se em seguida, 1,5 ml da mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (25:1). Esse microtubo recebeu inversões suaves até a homogeneização. Nesse último procedimento (clorofórmio/álcool isoamílico), o sobrenadante foi transferido para outro microtubo e adicionou-se um volume de acetato de amônio 7,5 M, equivalente a um terço do volume do sobrenadante.

Para precipitação do DNA foi adicionado 1 ml de álcool e realizou-se a centrifugação a 10.000 rpm por 5 minutos. O DNA foi desidratado em estufa a 60°C e ressuspendido em 500 µl de água Mili-Q-estéril após a secagem. O DNA foi quantificado para verificação da concentração (ng/µl) e da pureza (razão de absorbância A_{260}/A_{280}). Posteriormente, ocorreu a padronização das amostras em uma concentração de 100ng/µl.

4.4 Detecção do DNA viral

A detecção do BLV foi realizada através das técnicas de *Polimerase Chain Reaction* (PCR), *Real Time Quantitative Polimerase Chain Reaction* (qPCR) e *Nested PCR*. Os *primers* utilizados são os específicos para os genes *Tax* e *Gag* baseadas nos trabalhos de Buehring *et al.* (2014), Buehring *et al.* (2019) e Schwingel *et al.* (2019); as temperaturas de anelamento variam de 50°C a 65°C no intervalo de tempo entre 30s e 1min, com 25 a 45 ciclos. Para validação dos resultados, foi utilizado como controle positivo o DNA proviral extraído de cultura de células FLK (linhagem celular de rim fetal de ovinos) infectadas com o BLV, gentilmente concedidas pelo Dr. Antonio Carlos de Freitas, do Laboratório LEMTE, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Quadro 1 – Sequência dos *primers* utilizados para a detecção do DNA do BLV.

<i>Primers</i>	Sequência	Tamanho (pb)	Referências
<i>Tax</i>	F: CTTCGGGATCCATTACCTGA	373pb	Buehring <i>et al.</i> , (2014) Buehring <i>et al.</i> , (2019) Schwingel <i>et al.</i> , (2019)
	R: GCTCGAAGGGGGAAAGTGAA		
	F: ATGTCACCATCGATGCCTGG	113pb	Buehring <i>et al.</i> , (2014); Buehring <i>et al.</i> , (2017); Buehring <i>et al.</i> , (2019); Schwingel <i>et al.</i> , (2019)
	R: CATCGGCGGTCCAGTTGATA		

<i>Gag</i>	F: ACCCTACTCCGGCTGACCTA	272pb	Buehring <i>et al.</i> , (2014) Buehring <i>et al.</i> , (2019)
	R: CTTGGACGATGGTGGACCAA		

4.4.1 Detecção do DNA do BLV usando PCR convencional

Para a detecção do DNA do BLV, foram realizadas reações de PCR convencional para a amplificação de fragmentos dentro gene Tax (112pb) e Gag (272pb). As condições de amplificação e ciclagem de um fragmento do gene Tax e Gag, do BLV, estão descritas na Tabela 2 e 3. Os produtos gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador.

Tabela 2. Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (113 pb) por PCR convencional.

PCR convencional – Tax										
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Templ ate (μl)	Produto final (μl)	Desnatura ção inicial	Desnaturaç ão	Anelam ento	Extensão	Ciclo	Extensão final
12,5	1	1	2	25	95°C/5'	95°C/30"	60°C/1'	72°C/1'30"	30x	72°C/10'
12,5	1	1	2	25	95°C/5'	95°C/30"	59°C/1'	72°C/1'30"	30x	72°C/10'
10	1	1	2,5	20	95°C/2'	95°C/15"	60°C/1'	-	40x	-
10	1	1	2,5	20	95°C/2'	95°C/15"	55°C/1'	-	40x	-

Tabela 3. Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Gag (273 pb) por PCR convencional.

PCR convencional – Gag										
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Templ ate (μl)	Produto final (μl)	Desnatura ção inicial	Desnatur ação	Anelame nto	Extensã o	Ciclo	Extensã o final
12,5	1	1	2	25	95°C/5'	95°C/1'	56°C/45"	72°C/1'	35x	72°C/5'
12,5	1	1	2	25	95°C/3'	95°C/10"	55°C/45"	-	40x	-

4.4.2 Detecção do DNA do BLV usando *Nested* PCR

Além da PCR convencional, foram realizadas também reações de *Nested* PCR para a detecção de um fragmento do gene Tax (113pb) e Gag (272pb), do genoma do BLV. Para tal, foram realizadas as seguintes estratégias: i) *Auto-Nested* PCR, utilizando o mesmo set de *primer*- Tax (113pb) e Gag (272pb)- nas duas reações de PCR; ii) *Nested* PCR, utilizando um set de *primer* que amplifica um fragmento de 372pb na primeira reação e um outro set de *primer* que amplifica um fragmento de 113pb na segunda reação (*Inner*) para amplificar um fragmento de Tax. As condições de amplificação e ciclagem da *Nested* PCR de um fragmento do gene Tax e Gag estão descritas nas Tabelas 4, 5, 6 e 7. Os produtos gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador.

Tabela 4. Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (113 pb) por *Auto-Nested* PCR.

Tax (113) 1ª PCR										
M. mix (μ l)	Primer F (μ l)	Primer R (μ l)	Templ ate (μ l)	Produto final (μ l)	Desnatura ção inicial	Desnatur ação	Anelame nto	Extensã o	Ciclo	Extensã o final
12,5	1	1	2	25	95°C/5'	95°C/30"	59°C/1'	72°C/1'30"	30x	72°C/10'
12,5	1	1	2	25	95°C/2'	95°C/30"	52°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
7,5	1,5	1,5	2,5 (500 ng)	15	95°C/2'	95°C/30"	56°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
7,5	1,5	1,5	3,5 (700 ng)	15	95°C/2'	95°C/30"	56°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
10	1	1	2,5	20	95°C/2'	95°C/15"	60°C/1'	-	40x	-

Continuação

Nested Tax (113) 2ª PCR										
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Template (μl)	Produto final (μl)	Desnatur ação inicial	Desnatura ção	Anelamen to	Extensão	Ciclo	Extens ão final
12,5	1	1	2	25	95°C/5'	95°C/30"	59°C/1'	72°C/1'30"	30x	72°C/10'
12,5	1	1	1	25	95°C/2'	95°C/30"	52°C/30"	72°C/15"	30x	72°C/5'
7,5	1,5	1,5	2	15	95°C/2'	95°C/30"	56°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
7,5	1,5	1,5	3	15	95°C/2'	95°C/30"	56°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
10	1	1	2	20	95°C/2'	95°C/15"	60°C/1'	-	40x	-

Tabela 5. Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (372/113 pb) por *Nested* PCR.

1ª PCR – Tax (372pb)										
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Templ ate (μl)	Produto final (μl)	Desnatura ção inicial	Desnatura ção	Anelame nto	Extensã o	Ciclo	Extensã o final
12,5	1	1	2	25	95°C/2'	95°C/30"	55°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
6,25	0,5	0,5	2	12,5	95°C/2'	95°C/30"	55°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
6,25	0,5	0,5	2	12,5	95°C/2'	95°C/30"	59°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
12,5	1	1	2	25	95°C/5'	95°C/30"	60°C/1'	72°C/1'30"	30x	72°C/10'
12,5	1	1	2	25	95°C/2'	95°C/30"	50°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
12,5	1	1	2	25	95°C/2'	95°C/30"	62°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
12,5	1	1	2	25	95°C/2'	95°C/30"	60°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
12,5	1	1	2	25	95°C/2'	95°C/30"	58°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
12,5	1	1	2	25	95°C/2'	95°C/30"	52°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
12,5	1	1	2	25	95°C/3'	95°C/10"	52°C/45"	-	40x	-
5	1	2	2	10	95°C/3'	95°C/10"	55°C/45"	-	40x	-

Continuação

2ª PCR – Tax2 (113pb)										
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Template (μl)	Produto final (μl)	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclo	Extensão final
12,5	1	1	1	25	95°C/2'	95°C/30"	55°C/30"	72°C/15"	30x	72°C/5'
6,25	0,5	0,5	1	12,5	95°C/2'	95°C/30"	55°C/30"	72°C/15"	30x	72°C/5'
6,25	0,5	0,5	0,5	12,5	95°C/2'	95°C/30"	59°C/30"	72°C/15"	30x	72°C/5'
12,5	1	1	0,5	25	95°C/5'	95°C/30"	60°C/1'	72°C/1'30"	30x	72°C/10'
12,5	1	1	0,5	25	95°C/2'	95°C/30"	50°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
12,5	1	1	1	25	95°C/2'	95°C/30"	65°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
12,5	1	1	1	25	95°C/2'	95°C/30"	62°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
12,5	1	1	1	25	95°C/2'	95°C/30"	61°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
12,5	1	1	1	25	95°C/2'	95°C/30"	52°C/30"	72°C/26"	30x	72°C/5'
12,5	1	1	1	25	95°C/3'	95°C/10"	52°C/30"	-	25x	-
5	1	2	1	10	95°C/3'	95°C/10"	55°C/30"	-	25x	-

Tabela 6. Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (372pb) por Auto-Nested PCR.

1ª PCR								
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Template (μl)	Produto final (μl)	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Ciclo
12,5	1	1	2	25	95°C/3'	95°C/10"	55°C/45"	40x

Continuação

2ª PCR								
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Template (μl)	Produto final (μl)	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Ciclo
12,5	1	1	1	25	95°C/3'	95°C/10"	55°C/30"	25x

Tabela 7. Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Gag (272pb) por Auto-Nested PCR.

1ª PCR								
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Template (μl)	Produto final (μl)	Desnaturaçã o inicial	Desnaturaçã o	Anelament o	Ciclo
12,5	1	1	2	25	95°C/3'	95°C/10"	55°C/45"	40x

Continuação

Auto-Nested PCR 2ª PCR								
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Template (μl)	Produto final (μl)	Desnaturaçã o inicial	Desnaturaçã o	Anelamento	Ciclo
12,5	1	1	1	25	95°C/3'	95°C/10"	55°C/30"	25x

4.4.3 Detecção do DNA do BLV usando *Real Time* PCR

Além da PCR convencional e *Nested* PCR, foram realizadas amplificações do gene Tax e Gag utilizando *Real Time* PCR (RT-PCR) e *Nested* RT-PCR. As condições de amplificação e ciclagem da RT-PCR e *Nested* RT-PCR de um fragmento do gene Tax e Gag estão descritas na Tabela 8, 9, 10, 11 e 12. Para a confirmação da curva de *melting*, os produtos gerados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador.

Tabela 8. Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (113pb) por RT PCR.

PCR Real Time – Tax								
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Template (μl)	Produto final (μl)	Desnaturaçã o inicial	Desnaturaçã o	Anelament o	Ciclo
10	1	1	2,5	20	95°C/2'	95°C/15"	55°C/1'	40x
10	1	1	4	20	95°C/2'	95°C/15"	55°C/1'	40x
10	1	1	4	20	95°C/2'	95°C/15"	55°C/1'	40x
10	1	1	2,5	20	95°C/2'	95°C/15"	55°C/1'	40x
5	1	1	2	10	95°C/3'	95°C/10"	60°C/45"	35x
10	1	1	2,5	20	95°C/2'	95°C/15"	55°C/1'	40x

Tabela 9. Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Gag (272pb) por RT PCR.

PCR Real Time – Gag								
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Template (μl)	Produto final (μl)	Desnaturaçã o inicial	Desnaturaç ão	Anelament o	Ciclo
10	1	1	2,5	20	95°C/2'	95°C/15"	55°C/1'	40x
10	1	1	4	20	95°C/2'	95°C/15"	55°C/1'	40x
10	1	1	2,5	20	95°C/2'	95°C/15"	60°C/1'	45x
10	1	1	2,5	20	95°C/2'	95°C/15"	55°C/1'	45x
5	1	1	2	10	95°C/3'	95°C/10"	55°C/45"	40x

Tabela 10. Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (113pb) por *Nested* RT-PCR.

1ª PCR								
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Templat e (μl)	Produto final (μl)	Desnaturaçã o inicial	Desnaturaç ão	Anelament o	Ciclo
5	1	2	2	10	95°C/3'	95°C/10"	55°C/45"	40x

Continuação

2ª PCR								
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Templat e (μl)	Produto final (μl)	Desnaturaçã o inicial	Desnaturaç ão	Anelamento	Ciclo
5	1	2	1	10	95°C/3'	95°C/10"	55°C/30"	25x

Tabela 11. Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Gag (272pb) por *Nested* RT-PCR.

1ª PCR								
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Templat e (μl)	Produto final (μl)	Desnaturaçã o inicial	Desnaturaç ão	Anelament o	Ciclo
12,5	1	1	2	25	95°C/3'	95°C/10"	55°C/45"	40x

Continuação

2ª PCR								
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Template (μl)	Produto final (μl)	Desnaturaçã o inicial	Desnaturaçã o	Anelamento	Ciclo
12,5	1	1	1	25	95°C/3'	95°C/10"	55°C/30"	25x

Tabela 12. Condições de amplificação e ciclagem para a amplificação de um fragmento de Tax (273pb) por *Nested* RT-PCR.

1ª PCR								
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Template (μl)	Produto final (μl)	Desnaturaçã o inicial	Desnaturaçã o	Anelament o	Ciclo
5	1	2	2	10	95°C/3'	95°C/10"	55°C/45"	40x

Continuação

2ª PCR								
M. mix (μl)	Primer F (μl)	Primer R (μl)	Template (μl)	Produto final (μl)	Desnaturaçã o inicial	Desnaturaçã o	Anelamento	Ciclo
5	1	2	1	10	95°C/3'	95°C/10"	55°C/30"	25x

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das amostras

As amostras de CM foram também categorizadas de acordo com a classificação molecular, a localização anatômica do tumor, índice mitótico, grau de pleomorfismo nuclear, diferenciação tubular e o grau histológico. No que concerne à localização do tumor, o maior número de casos foi na mama esquerda (50%), embora seja próximo ao número observado na mama direita (49,5%). A classificação histopatológica mais predominante foi o TNE/ SOE (80,1%) (Tabela 13).

Em relação a classificação molecular, o subtipo Luminal A foi o mais comum (35,7%), a seguido do Luminal B e Her2 positivo com 20% e 16,8%, respectivamente. Parte significativa das amostras apresentaram índices mitóticos escore I (52,8%), indicando que a maior parte dos tumores eram de crescimento lento, seguido pelo escore II (27,4%) e escore III (17%) (Tabela 13).

O pleomorfismo nuclear escore III foi o mais presente (65,1%), seguido pelo escore II (31,1%). Na diferenciação tubular, o escore III apresentou maior frequência (68,9%), seguido pelo escore II (25,5%). Com relação ao grau histológico, 50,5% dos casos foi classificado como grau II e 31,4% grau III. O Ki-67 < 30 correspondeu a 75,5%. Entre as amostras estudadas 58,5% não apresentaram invasão angiolinfática, apenas 25,5% dos casos apresentavam (Tabela 13).

Tabela 13 – Caracterização das amostras de CM em relação a idade, localização anatômica, grau histológico, classificação histopatológica, classificação molecular, índice mitótico, grau de pleomorfismo nuclear, diferenciação tubular, grau histopatológico, invasão angiolinfática e expressão da proteína Ki-67.

	Variável	(%)
Idade	Até 25 Anos	3,8
	26 a 40 anos	27,4
	41 a 60 anos	49,5
	Acima 60 anos	19,4
Localização Anatômica	Mama direita	49,5
	Mama esquerda	50
	Ambas as mamas	0,5

Classificação histopatológica	TNE/SOE	80,1
	CDINV	9,1
	CDI	7,5
	CDIISBR	1,1
	CDL	0,5
	CINADER	0,5
	CILOB	0,5
	CDIAPOC	0,5
Classificação molecular	Luminal A	35,7
	Luminal B	20
	Her2 positivo	16,8
	TNBC	12,4
	Não classificado	8,6
	Super Her2	3,2
	Luminal Her2	3,2
Índice mitótico	Escore I	52,8
	Escore II	27,4
	Escore III	17
	Não diferenciado	2,8
Grau de pleomorfismo nuclear	Escore III	65,1
	Escore II	31,1
	Escore I	0,9
	Não diferenciado	2,8
Diferenciação tubular	Escore III	68,9
	Escore II	25,5
	Escore I	4,7
	Não diferenciado	0,9
Grau histopatológico	Grau 3	31,4
	Grau 2	50,5
	Grau 1	10,5
	Não diferenciado	7,6

Ki-67	<30	75,5
	>30	21,5
	Negativo	2,7
Invasão	Ausente	58,5
vascular/Angiolinfática	presente	25,5
	Não diferenciado	16

Carcinoma invasivo tipo não específico, também chamado de carcinoma sem outras especificações (TNE/SOE); **Luminal A** = RE+ e/ou RP+ ; HER2 - e Ki-67 < 14%; **Luminal B** = RE+ e/ou RP+ ; HER2 - e Ki-67 $\geq$ 14%; **HER2-** RE- e RP- ; HER2 +; **Índice mitótico**: escore= 1, até sete figuras de mitoses; escore = 2, de oito a 15 figuras de mitoses e escore 3, mais que 15 figuras de mitoses; **Pleomorfismo nuclear**: escore 1, com núcleos são regularmente uniformes (discreto); escore 2, com aumento no tamanho e na variabilidade nuclear (moderado); escore 3, com uma maior variação na forma e no tamanho nuclear (acentuado); **Formação tubular**: escore I, a maior parte do tumor forma túbulos (> 75%); escore II, a formação de túbulos é moderada (10% a 75%); escore III, a formação de túbulos é pouca ou nenhuma (< 10%); **Grau Histológico**: I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (pouco diferenciado). **Classificação histopatológica**: TNE/SOE- Carcinoma ductal invasivo sem outras especificações; CDI- Carcinoma ductal infiltrante; CDIISBR- Carcinoma ductal infiltrante intermediário de Scarff-Bloom-Richardson; CDINV- Carcinoma ductal invasivo; CDL- Carcinoma mamário invasivo com características ductais e lobulares; CINADER- Carcinoma intraductal de padrão aderente; CILOB- Carcinoma invasivo de padrão morfológico lobular e CDIAPOC- Carcinoma invasivo de padrão apócrino **Fonte**: Elaborado pelo autor (2023)

5.2 Detecção do genoma do BLV

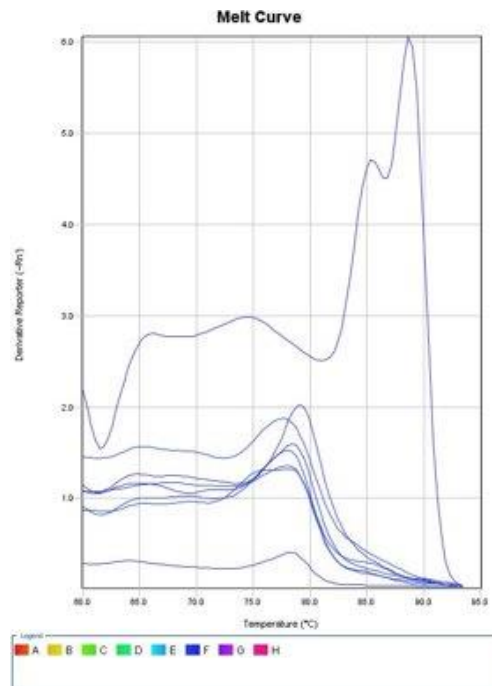
Como controle da qualidade do DNA extraído, amplificações com o conjunto de *primers* que amplificam o gene da β -globina foram realizadas. Todas as 189 amostras amplificaram um fragmento do gene da β -globina, sinalizando a boa qualidade do DNA extraído.

Para a detecção do DNA do BLV, foram utilizadas as estratégias de PCR convencional, qPCR e *Nested* PCR.

5.2.1 Detecção pela PCR convencional

Os resultados não mostraram a presença do DNA do BLV em nenhuma amostra de CM, apenas o controle positivo foi amplificado utilizando a PCR convencional (Figura 6).

Figura 6 – Curva de *melting* de uma PCR convencional, usando o *primer* Tax (113pb).

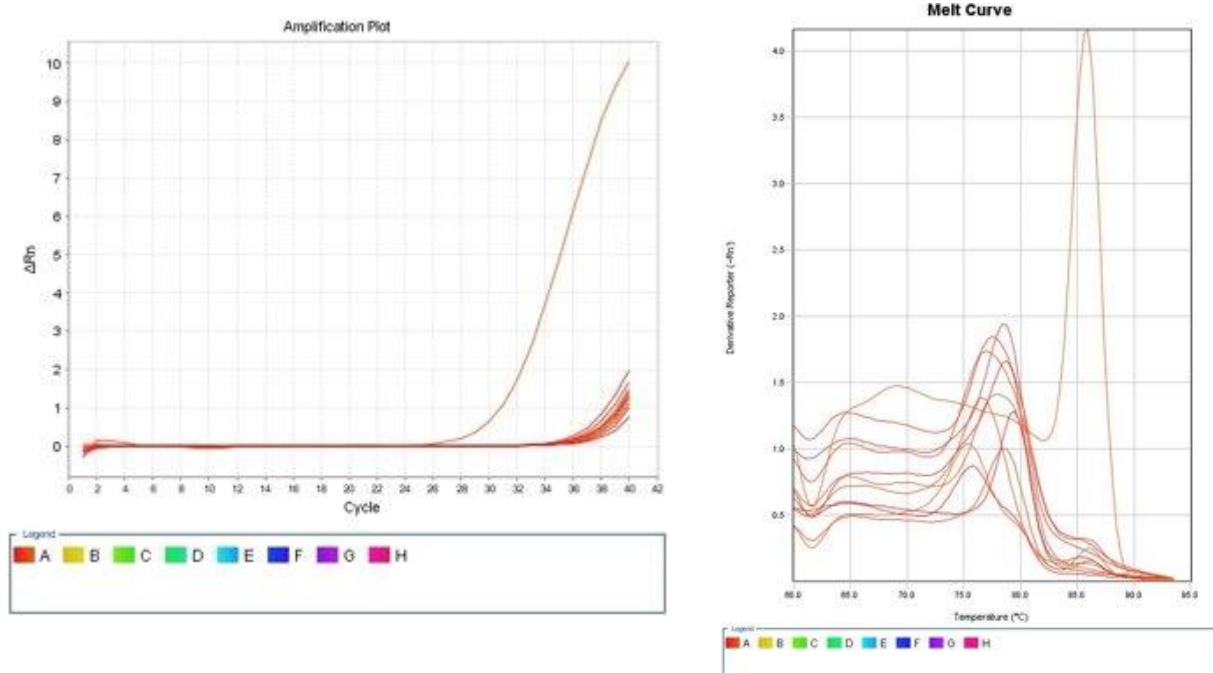


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.2.2 Detecção pela qPCR

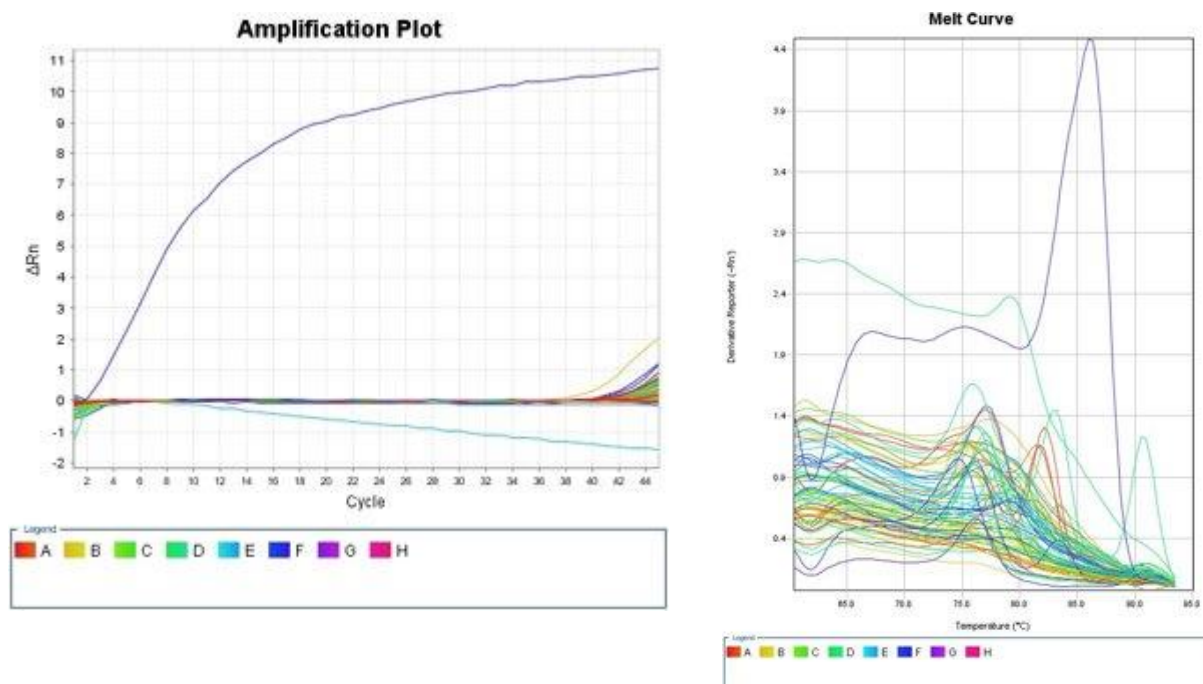
Os resultados não mostraram a presença do DNA do BLV em nenhuma amostra de CM, apenas o controle positivo foi amplificado utilizando a qPCR (Figuras 7 e 8).

Figura 7 – Resultado de uma das qPCRs usando o *primer* Tax (113pb).



Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Figura 8: Resultado de uma das q-PCR usando o *primer* Gag (272pb).

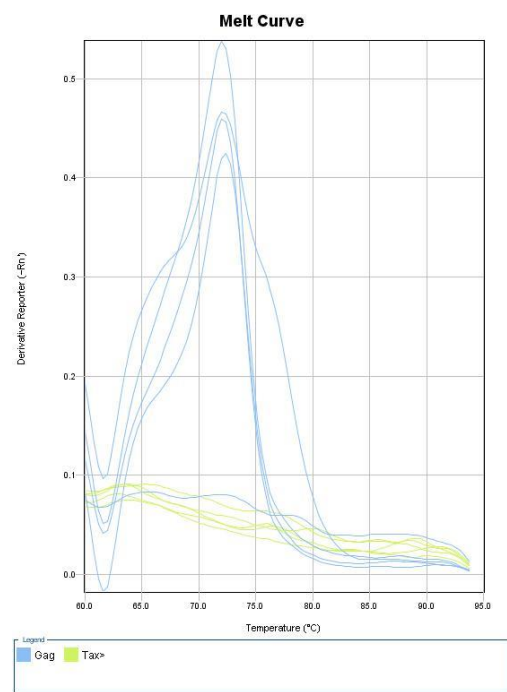


Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.2.3 Detecção pela *Nested* PCR

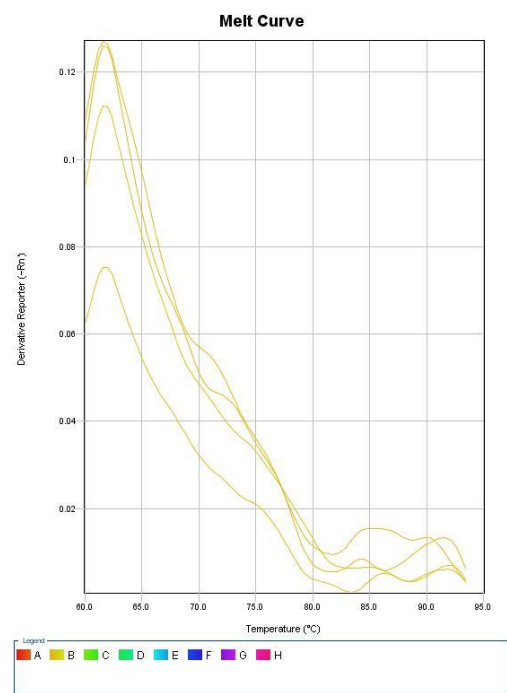
Os resultados não mostraram a presença do DNA do BLV em nenhuma amostra de CM, apenas o controle positivo foi amplificado utilizando a *Nested* PCR (Figuras 9 e 10).

Figura 9: Resultado de uma das *Auto Nested* PCR usando o *primer* Gag (272pb) e Tax (113pb).*



*Somente amostras e controle negativo
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

Figura 10: Resultado de uma das *Nested* PCR usando os *primers* Tax (373pb) e Tax (113pb).*

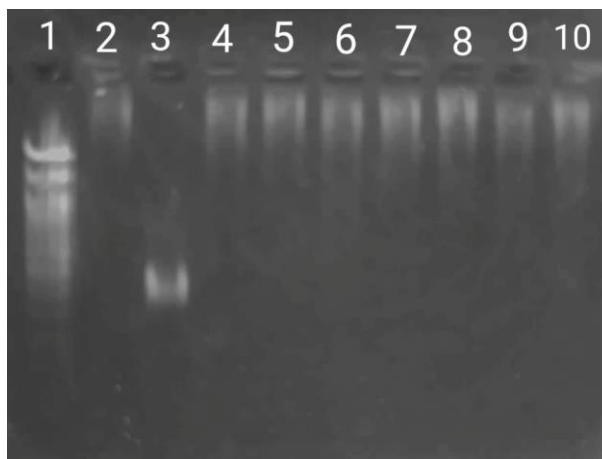


*Somente amostras e controle negativo
Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

5.2.4 Eletroforese

Os produtos gerados através das diversas técnicas executadas nesse estudo foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a corrida, o gel foi visualizado em um transiluminador e confirmou-se a ausência do material genético pesquisado.

Figura 11: Resultado de uma das eletroforeses em gel de agarose a 1%.



1: marcador de peso molecular 100bp; 2: controle negativo; 3: controle positivo; 4-10 amostras de um dos testes realizados.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023)

7. DISCUSSÃO

O presente trabalho executou diversas estratégias de detecção, como a PCR convencional, qPCR e *Nested* PCR variando temperatura e tempo de anelamento, além da quantidade de ciclos das reações e não encontrou amplificação das regiões pesquisadas, exceto na amostra de controle positivo. Os resultados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose à 1% em que apenas a amostra de controle positivo apresentou resultado compatível com a amplificação da região em análise.

O câncer de mama é uma doença rara em mulheres jovens. Sua incidência aumenta com a idade, a maior parte dos casos ocorre a partir dos 50 anos (INCA, 2019b) e a média de idade das pacientes desse estudo foi de 53,17 e semelhante à média encontrada por Schiwngel *et al.* (2019) de 52,4, Buehring *et al.* (2015) de 55,9, Baltzell *et al.* (2017) de 54,59 e Buehring *et al.* (2017) de 55,08.

O subtipo histológico mais prevalente foi o TNE/SOE com 80,1% semelhante ao encontrado por Bilani *et al.* (2020) que conduziram um estudo transversal nos EUA com dados de mais de 2,6 milhões de pacientes e o Carcinoma ductal foi o mais prevalente com 70,3% das amostras, também Giovana *et al.* (2013) com 77,4% das amostras e corroborando com dados do Inca (2019b) e da American Cancer Society (2019) que o indicam como o tipo histológico mais comum.

O grau histopatológico 2 foi encontrado na maioria das amostras (50,5%) e assemelha-se com dados de Schiwngel *et al.* (2019) em que o grau 2 também foi o mais encontrado com 47,2%; o grau 1 foi o menos encontrado tanto nas nossas amostras, 10,5%, quanto nas de Schiwngel *et al.* (2019), 9,1%.

As amostras analisadas apresentam dados de classificação molecular do câncer de mama semelhantes a outros estudos, identificando o luminal A como o subtipo mais comum entre as pacientes, seguido do Luminal B e Her2, respectivamente (GOGIA *et al.*, 2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; AL-THOUBAITY, 2020; JOHNSON, CONANT e SOO, 2021).

Algumas investigações sugerem uma associação entre o vírus da leucemia bovina (BLV) e o câncer de mama, embora o envolvimento desse vírus como fator de risco permanece controverso (MARAWAN *et al.*, 2021). No presente estudo, não houve

amplificação das regiões tax e gag nas amostras analisadas, sendo possível observar apenas amplificação das amostras controle (Figuras 6, 7 e 8).

Isso corroborou com resultados de Zhang *et al.* (2016), que realizaram sete PCRs *in situ* e uma PCR em tempo real e não detectaram o BLV em tecido de câncer de mama de 91 pacientes, bem como de amostras de sangue de 160 mulheres chinesas com câncer de mama de quatro bancos de tecidos.

Em complemento, Saito *et al.* (2020) não detectaram o pró-vírus do BLV empregando uma PCR altamente sensível com *primers* para as regiões LTR, gag, pol, env e tax em 145 linhagens de células sanguíneas humanas japonesas e 54 linhas celulares de diferentes cânceres humano, incluindo o de mama.

Além disso, Gillet e Willems (2016) avaliaram 51 genomas inteiros de amostras de câncer de mama e 19 biópsias adjacentes aos tumores de mama, usando dados recuperados do banco de dados NCBI de genótipo e fenótipo (dbGaP) e incluindo amostras dos Estados Unidos, México, Vietnã e excluíram a inserção clonal de BLV em células tumorais.

De fato, os resultados obtidos divergem de outros que identificaram fragmentos do genoma viral em amostras de câncer de mama humano, como de Buehring *et al.* (2007) nos Estados Unidos, em que avaliaram 213 amostras de tecido mamário fixadas em formalina (110 mulheres com câncer de mama e 103 mulheres sem histórico de câncer de mama) usando PCR *in situ* com *primers* da região tax do BLV e relataram a detecção em 59% dos casos e 29% dos controles.

Buehring *et al.* (2015), ainda nos Estados Unidos, realizaram a detecção pela PCR *in situ*, usando o *primer* para a região Tax, em tecidos de mama fixados em formalina e embebidos em parafina de 239 doadores, em que 114 eram diagnosticadas com câncer de mama invasivo e obtiveram a frequência de exposição ao BLV em 59% dos tecidos malignos, 38% dos tecidos com alterações pré-malignas e 29% dos tecidos de controles normais como positivos para o BLV.

Acrescenta-se ainda, Buehring *et al.* (2017) na Austrália, usando a mesma metodologia anterior, estudaram amostras parafinadas de 96 mulheres australianas, relatando a detecção do DNA pró-viral do BLV no tecido mamário em 80% das mulheres com câncer de mama em comparação com 41% das mulheres sem histórico de câncer de mama.

Além dessas, inclui também a pesquisa de Lendez *et al.* (2018) que testaram 85 amostras parafinadas de mulheres argentinas através da PCR *in situ* e determinaram uma positividade de 22,6% das amostras analisadas.

Os referidos estudos encontraram uma positividade em amostras parafinadas utilizando a PCR *in situ* como método de detecção, entretanto outros métodos também foram aplicados e obtiveram resultados positivos, como a PCR convencional na Colômbia (GIOVANA *et al.*, 2013), realizada em 106 amostras e utilizando o *primer* para um segmento do gene gag e encontraram uma positividade de 35% dentre as amostras de câncer de mama e 45% dentre as amostras negativas de câncer de mama.

Outro método foi a *Nested* PCR utilizada por Khalilian *et al.* (2019) que pesquisaram em um total de 400 amostras, incluindo 200 amostras de tecido com suspeita de câncer de mama e 200 amostras de sangue de mulheres sem câncer de mama de hospitais do Irã utilizando *primers* para as regiões tax e gag. Eles detectaram 30% de positividade com tax e 8% com gag das amostras de tecido com suspeita de câncer de mama. A frequência de BLV em amostras de sangue coletadas de mulheres sem câncer de mama foi de 16,5%.

A *Nested* PCR também foi realizada no Brasil (SCHWINGEL *et al.*, 2019) com 144 mulheres divididas em dois grupos: com 72 mulheres saudáveis submetidas à cirurgia de redução de mama e 72 mulheres com diagnóstico de carcinoma invasivo da mama sem tipo especial, submetidas a mastectomia ou segmentectomia mamária e foram positivas para a região tax 13,9% e 30,5% das amostras, respectivamente.

Alguns fatores podem interferir nos resultados, como a utilização de métodos de detecção diferentes afetando a sensibilidade do teste, a diversidade da região pesquisada entre os estudos, a heterogeneidade entre as amostras de cada trabalho, a qualidade dos insumos utilizados em cada reação, são possíveis explicações para a multiplicidade de resultados.

Adekanmbi *et al.* (2021) afirmam que quase todos os estudos usando imuno-histoquímica e PCR *in situ* demonstraram positividade das amostras, enquanto outros estudos usando sequenciamento de todo o genoma e outros métodos não foram tão eficazes na identificação da associação do BLV com o câncer de mama. Os autores ainda sugerem que estudos adicionais, incluindo todas as técnicas/métodos de detecção de BLV sendo executados nos mesmos conjuntos de amostras de câncer de mama, como a forma mais provável de resolver as evidências contraditórias atuais.

Uma possível explicação dessa diferença, além dos métodos de detecção, pode estar relacionada a raça ou cor das mulheres participantes dos estudos. Segundo Buehring (2015), a relação de BLV e câncer de mama não foi estatisticamente significativa entre as mulheres

afrodescendentes e isso pode ser devido ao estilo de vida, hábitos alimentares e diferenças genéticas. Schwingel *et al.* (2019) avaliaram amostras do Rio Grande do Sul na região sul do Brasil, em que há predomínio de população de cor branca, enquanto o presente estudo utilizou amostras do Estado da Paraíba, no Nordeste, região que possui a maior proporção de pessoas declaradas da cor preta no Brasil (IBGE, 2019).

Além disso, os hábitos alimentares são diferentes, as regiões Centro-Oeste e Sul possuem frequência de consumo alimentar de carne bovina maior que as demais regiões, enquanto o Nordeste apresenta a menor frequência do país (IBGE, 2020). Outrossim, o Rio Grande do Sul é considerado um dos Estados que mais consome leite e derivados, ficando atrás apenas de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (FIESP, 2022).

Vale ressaltar ainda a possibilidade de interferência nos resultados devido às amostras serem provavelmente de população urbana e existir uma expectativa maior de contaminação em indivíduos de área rural que tenham contato com os animais infectados. Contudo, mais estudos precisam ser conduzidos para esclarecer as lacunas que este estudo não pode identificar.

7. CONCLUSÕES

O genoma do BLV não foi detectado em biópsias pacientes com CM, residentes da Paraíba, Nordeste do Brasil. Contudo, futuros estudos utilizando diferentes estratégias de detecção devem ser realizados para esclarecer o possível envolvimento desse vírus na carcinogênese ou agressividade tumoral.

REFERÊNCIAS

- ADEKANMBI, F. McNEELY, I.; OMELER S.; KALALAH, A.; POUDEL, A.; MERNER, N.; WANG, C. Absence of bovine leukemia virus in the buffy coats of breast cancer cases from Alabama, USA. **Microb Pathog.** v. 161, p. 105238, 2021. doi: 10.1016/j.micpath.2021.105238.
- AIDA, Y., MIYASAKA, M.; OKADA, K.; ONUMA, M.; KOGURE, S.; SUZUKI, M.; MINOPRIO, P.; LEVY, D.; IKAWA, Y. Further phenotypic characterization of target cells for bovine leukemia virus experimental infection in sheep. **Am J Vet Res.** v. 50, n. 11, p. 1946-1951, 1989.
- AIDA, Y.; MURAKAMI, H.; TAKAHASHI, M.; TAKESHIMA, S-N. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. **Front Microbiology**, v. 4, p. 328, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00328.
- AL-THOUBAITY, Fatma Khinaifis. Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study. **Annals of medicine and surgery**, v. 49, p. 44-48, 2020.
- ALTANEROVA, V., BAN, J.; KETTMAN, R.; ALTANER, C. Induction of leukemia in chicken by bovine leukemia virus due to insertional mutagenesis. **Archiv Geschwulstforschung**, v. 60, n. 2, p. 89-96, 1990.
- ALTANEROVA, V.; PORTETELLE, D.; KETTMAN, R.; ALTANER, C. Infection of rats with bovine leukaemia virus: establishment of a virus-producing rat cell line. **J Gen Virol.** v. 70, n. 7, p. 1929-1932, 1989.
- ALTANEROVA, V., BAN, J., e ALTANER, C. Induction of immune deficiency syndrome in rabbits by bovine leukaemia virus. **AIDS.** v. 3, n. 11, p. 755-758, 1989.
- 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 13 de out. de 2021
- BALTZELL, K.A.; SHEN, H.M.; KRISHNAMUTRTHY, S.; SISON, J.D.; NUOVO, G.J.; BUEHRING, G. C. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas. **Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1342-1349, 2018.
- BAI, L.; SATO, H.; KUBO, Y.; WADA, S.; AIDA, Y. CAT1/SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection. **FASEB J.** v. 33, n. 12, p. 14516-14527, 2019.
- BAN, J., PORTETELLE, D.; ALTANER, C.; HORION, B.; MILAN, D.; KRCHNAK, V.; BURNY, A.; KETTMAN, R. Isolation and characterization of a 2.3-kilobase-pair cDNA fragment encoding the binding domain of the bovine leukemia virus cell receptor. **J Virol.** v. 67, n. 2, p. 1050-1057, 1993.

BAREZ, P.-Y.; BROGNIEZ, A.; CARPENTIER, A.; GAZON, H.; GILLET, N.; GUTIÉRREZ, G.; HAMADIA, M.; JACQUES, J.-R.; PERIKE, S.; SRIRAMAREDDY, S.N.; RENOTTE, N.; STAUMONT, B.; REICHERT, M.; TRONO, K.; WILLEMS, L. Recent advances in BLV research. **Viruses**, v. 7, n. 11, p. 6080-6088, 2015.

BARTLETT, P.C.; SORDILLO, L.M.; BYREM, T.M.; NORBY, B.; GROOMS, D.L.; SWENSON, C.L.; ZALUCHA, J.; ERSKINE, R.J. Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. **J Am Vet Med Assoc**. v. 244, n. 8, p. 914-922, 2014.

BENDER, A.P.; ROBISON, L.L., KASHMIRI, S.V., McCLAIN, K.L., WOODS, W.G., SMITHSON, W.A., HEYN, R., FINLAY, J., SCHUMAN, L.M., RENIER, C. No involvement of bovine leukemia virus in childhood acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. **Cancer Res**. v. 48, n. 10, p. 2919-2922, 1988.

BILANI, Nadeem *et al.* Breast cancer in the United States: a cross-sectional overview. **Journal of cancer epidemiology**, v. 2020, 2020.

BRAGA, F.M.; LAAN, C.W.; SCHUCH, L.P.; HALFEN, D.C. Infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (BLV). **Ciênc Rural**, v. 28, p. 163-172, 1998.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R.L.; TORRE, L.A.; REDDIE, A.J. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Vclin**. v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

BUEHRING, G.C.; DeLANEY, A.; SHEN, H.; CHU, D.L.; RAZAVIAN, N.; SCHWARTZ, D.A.; DEMKOVICH, Z.R.; BATES, M.N. Bovine leukemia virus discovered in human blood. **BMC Infect Dis**. v. 19, n. 1, p. 297, 2019. doi: 10.1186/s12879-019-3891-9.

BUEHRING, G.C.; SHEN, H.M.; JENSEN, H.M.; CHOI, K.Y.; SUN, D.; NUOVO, G. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. **Emerg Infect Dis**. v. 20, n. 5, p. 772-782, 2014.

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**, v. 10, n. 9, p. e0134304, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0134304.

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, n. 6, p. e0179367, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0179367.2017.

BURNY, A.; BRUCK, C.; CLEUTER, Y.; COUEZ, D.; DECHAMPS, J.; GREGORIE, J.; GHYSDADEL, J.; KETTMAN, R.; MAMMARICKX, M.; MARBAIX, G.; PORTETELLE, D. JOHNSON, R.; KANEENE, J.B. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leukosis. **Onderstepoort J Vet Res**. v. 52, p. 133-144, 1985.

CAMARGOS, M.F.; REIS, J.K.P.; LEITE, R.C. Bovine leukemia virus. **Virus Rev Res**. v. 9, n. 1, p. 44-59, 2004.

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

COLDITZ, G.A.; BOHLKE, K. Priorities for the primary prevention of breast cancer. **CA Cancer J Clin.** v. 64, n. 3, p. 186-194, 2014.

CUESTA, L.M.; LENDEZ, P.A.; FARIAS, M.V.N.; DOLCINI, G.L.; CERIANI, M.C. Can bovine leukemia virus be related to human breast cancer? A review of the evidence. **J Mammary Gland Biol Neoplasia.** v. 23, n. 3, p. 101-107, 2018.

DANTAS, R.N.; DE SOUZA, A.U.; TAKENO, S.S.; KASSAB, P.; MALHEIROS, C.A.; LIMA, E.M. Association between PSCA, TNF- α , PARP1 and TP53 Gene Polymorphisms and Gastric Cancer Susceptibility in the Brazilian Population. **Asian Pac J Cancer Prev.** v. 21, n. 1, p. 43-48, 2020.

DE BROGNIEZ, A.; MAST, J.; WILLEMS, L. Determinants of the bovine leukemia virus envelope glycoproteins involved in infectivity, replication and pathogenesis. **Viruses**, v. 8, n. 4, p. 88, 2016.

FERRER, J.F.; KENYON, S.J.; GUPTA, P. Milk of dairy cows frequently contains a leukemogenic virus. **Science.** v. 213, n. 4511, p. 1014-1016, 1981.

GILLET, N.A.; WILLEMS, L. Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA. **Retrovirology.** v. 13, n. 1, p. 75, 2016.

GILLET, N.; FLORINS, A.; BOXUS, M.; BURTEAU, C.; NIGRO, A.; VANDERMEERS, F.; BALON, H.; BOUZAR, A-B.; DEFOICHE, J.; BURNY, A.; REICHERT, M.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology.** v. 4, n. 1, p. 18, 2007.

GIOVANNA, M.; ULLOA, J.C.; URIBE, A.M.; GUTIERREZ, M.F. Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue. **Open J Med Microbiol.** v. 3, n. 1, p. 84-90, 2013.

GOGIA, Ajay *et al.* Clinicopathological profile of breast cancer: An institutional experience. **Indian journal of cancer**, v. 55, n. 3, p. 210-213, 2018.

HARBECK, N., PENAULT-LLORCA, F., CORTES, J.; GNANT, M.; HOUSSAMI, N.; POORTMANS, P.; RUDDY, K.; TSANG, J.; CARDOSO, F. Breast cancer. **Nat Rev Dis Primers.** v. 5, p. 66, 2019. doi: 10.1038/s41572-019-0111-2.

HOPKINS, S.G.; DIGIACOMO, R.F. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. **Vet Clin North Am Food Anim Pract.** v. 13, n. 1, p. 107-128, 1997.

INABE, K., IKUTA, K., AIDA, Y. Transmission and propagation in cell culture of virus produced by cells transfected with an infectious molecular clone of bovine leukemia virus. **Virology**, v. 245, n. 1, p. 53-64, 1998.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2020.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019a.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Tipos de câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>. Acesso em: 5 set 2019b.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **A situação do câncer de mama no Brasil**: síntese de dados dos sistemas de informação. Rio de Janeiro: INCA, 2019c. 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: 18 jun 2021.

JOHNSON, Karen S.; CONANT, Emily F.; SOO, Mary Scott. Molecular subtypes of breast cancer: a review for breast radiologists. **Journal of Breast Imaging**, v. 3, n. 1, p. 12-24, 2021.

KHALILIAN, Mohaddeseh; HOSSEINI, Seyed Masoud; MADADGAR, Omid. Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women. **Microbial pathogenesis**, v. 135, p. 103566, 2019.

KUCZEWSKI, A.; ORSEL, K.; BARKEMA, H.W.; MASON, S.; ERSKINE, R.; VAN DER MEER, F.. Invited review: Bovine leukemia virus—Transmission, control, and eradication. **J Dairy Sci.** v. 104, n. 6, p. 6358-6375, 2021.

LAIRMORE, M.D. Animal models of bovine leukemia virus and human T-lymphotrophic virus type-1: insights in transmission and pathogenesis. **Annu Rev Anim Biosci.** v. 2, n. 1, p. 189-208, 2014.

LAWSON, J.S.; GLENN, W.K. Multiple oncogenic viruses are present in human breast tissues before development of virus associated breast cancer. **Infect Agent Cancer.** v. 12, n. 1, p. 55, 2017.

LAWSON, J.S.; SALMONS, B.; GLENN, W.K. Oncogenic viruses and breast cancer: Mouse mammary tumor virus (MMTV), bovine leukemia virus (BLV), human papilloma virus (hpv), and epstein–barr virus (EBV). **Front Oncol.** v. 8, p. 1, 2018.

LEE, J.; KIM, Y.; KANG, C.S.; CHO, D.H.; SHIN, D.H.; YUM, Y.N.; OH, J.H.; KIM, S.H.; HWANG, M.S.; LIM, C.J.; YANG, K.W.; HAN, K. Investigation of the bovine leukemia virus proviral DNA in human leukemias and lung cancers in Korea. **J Korean Med Sci.** v. 20, n. 4, p. 603-606, 2005.

LEISERING, A. Hypertrophy der Malpighischen Körperchen der Milz. **Bericht über das Veterinarwesen im Königreich Sachsen.** v. 16, 1871.

LENDEZ, P.A.; CUESTA, L.M.; FARIAS, M.V.N.; SHEN, H.M.; DOLCINI, G.L.; BUEHRING, G.C.; CERIANI, M.C. Bovine leukemia virus presence in breast tissue of argentinian females and its association with cell proliferation and prognostic markers. **Multidiscip Cancer Investig.** v. 2, n. 4, p. 16-24, 2018.

LEUZZI JUNIOR, L.Ál.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Enzootic bovine leukosis and Bovine leukemia virus. **Semina Ciênc Agr.** v. 22, n. 2, p. 211-221, 2001.

MAMMERICKX, M.; PORTETELLE, D.; BURNY, A. Experimental cross-transmissions of Bovine Leukemia Virus (BLV) between several animal species. **Zentralblatt Für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 28, n. 1, 1981.

MARAWAN, M.A.; ALOUFFI, A.; EL TOKHY, S.; BADAWY, S.; SHIRANI, I.; DAWOOD, A.; GUO, A.; ALMUTAIRI, M.M.; ALSHAMMARI, F.A.; SELIM, A. Bovine Leukaemia Virus: Current Epidemiological Circumstance and Future Prospective. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2167, 2021.

MARTEL, C.; GEORGES, D.; BRAY, F.; FERLAY, J.; CLIFFORD, G.M. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **Lancet Glob Health.** v. 8, n. 2, p. e180-e190, 2019. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7.

MCCLURE, H.M.; KEELING, M.E.; CUSTER, R.P.; MARSHAK, R.R.; ABT, D.A.; FERRER, J.F. Erythroleukemia in two infant chimpanzees fed milk from cows naturally infected with the bovine C-type virus. **Cancer Research**, v. 34, n. 10, p. 2745-2757, 1974.

MEKATA, H.; YAMAMOTO, M.; HAYASHI, T.; KIRINO, Y.; SEKIGUCHI, S.; KONNAI, S.; HORII, Y.; NORIMINE, J. Cattle with a low bovine leukemia virus proviral load are rarely an infectious source. **Jpn J Vet Res.** v. 66, n. 3, p. 157-163, 2018.

MILLER, J.M.; MILLER, L.D.; OLSON, C.; GILLETTE, K.G. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. **J Nat Cancer Institute.** v. 43, n. 6, p. 1297-1305, 1969.

MIRSKY, M.L.; OLMSTEAD, C.A.; DA, Y.; LEWIN, H.A. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. **J Virol.** v. 70, n. 4, p. 2178-2183, 1996.

MIRZAEI, H.; GHORBANI, S.; KHANIZADEH, S.; NAMDARI, H.; FAGHIHLOO, E.; AKBARI, A. Histone deacetylases in virus-associated cancers. **Rev Med Virol.** v. 30, n. 1, p. e2085, 2020. doi: 10.1002/rmv.2085.

MIYASAKA, T.; OGUMA, K.; SENTSU, H. Distribution and characteristics of bovine leukemia virus integration sites in the host genome at three different clinical stages of infection. **Arch Virol.** v. 160, n. 1, p. 39-46, 2015.

NAGAOKA, Y.; KABEYA, H.; ONUMA, M.; KASAI, N.; OKADA, K.; AIDA, Y. Ovine MHC class II DRB1 alleles associated with resistance or susceptibility to development of bovine leukemia virus-induced ovine lymphoma. **Cancer Res.** v. 59, n. 4, p. 975-981, 1999.

NIKBAKHT, B.G.H.; RABANI, M.; EMAM, M.; TOFIGHI, E.R. Serological and genomic detection of bovine leukemia virus in human and cattle samples. **Iran J Vet Med.** v. 4, n. 4, 2010. doi: 10.22059/IJVM.2010.22109.

OHNUKI, N.; KOBAYASHI, T.; MATSUO, M.; NISHIKAKU, K.; KUSAMA, K.; TORII, Y.; INAGAKI, Y.; HORI, M.; IMAKAWA, K.; SATOU, Y. A target enrichment high throughput sequencing system for characterization of BLV whole genome sequence, integration sites, clonality and host SNP. **Sci Rep.** v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

OIE – WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. **Office international des epizooties, Paris, France**, p. 1113-1124, 2018. Disponível em <<https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>>. Acesso em: 13 out 2021.

OLAYA-GALAN, N.N.; CORREDOR-FIGUEROA, A.P.; GUZMÁN-GARZÓN, T.C.; RÍOS-HERNANDEZ, K.S.; SALAS-CÁRDENAS, S.P.; PATARROYO, M.A.; GUTIERREZ, M.F. Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption. **Epidemiol Infect.** v. 145, n. 15, p. 3125-3130, 2017.

OLSON, C.; KETTMANN, R.; BURNY, A.; KAJA, R. Goat lymphosarcoma from bovine leukemia virus. **J Nat Cancer Institute.** v. 67, n. 3, 1981.

ONUMA, M.; HONMA, T.; MIKAMI, T.; ICHIJO, S.; KONISHI, T. Studies on the sporadic and enzootic forms of bovine leukosis. **J Comp Pathol.** v. 89, n. 2, p. 159-167, 1979.

PANEL, C.J.; TAKESHIMA, S-N.; OMORI, NUNOYA, T.; DAVIS, W.C.; ISHIZAKI, H.; MATOBA, K.; AIDA, Y. 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 Vet Res.** v. 9, n. 1, p. 95, 2013. doi: 10.1186/1746-6148-9-95.

PHILPOTT, Sean M.; BUEHRING, Gertrude C. Defective DNA repair in cells with human T-cell leukemia/bovine leukemia viruses: role of tax gene. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 11, p. 933-942, 1999.

PLUTA, A.; ROLA-ŁUSZCZAK, M.; DOUVILLE, R.N.; KUŹMAK, J. Bovine leukemia virus long terminal repeat variability: identification of single nucleotide polymorphisms in regulatory sequences. **Virology J.** v. 15, n. 1, p. 165, 2018.

POLAT, M.; TAKESHIMA, S-N.; HOSOMICHI, K.; KIM, J.; MIYASAKA, T.; YAMADA, K.; ARAINGA, M.; MURAKAMI, T.; MATSUMOTO, Y.; DIAZ, V.B.; PANEL, C.J.; GONZÁLEZ, E.T.; KANEMAKI, M.; ONUMA, M.; GIOVAMBATTISTA, G.; AIDA, Y. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. **Retrovirology**, v. 13, n. 1, p. 4, 2016.

POLAT, M.; TAKESHIMA, S-N.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology J.** v. 14, n. 1, p. 209, 2017.

PRAT, A.; CAREY, L.A.; ADAMO, B.; VIDAL, M.; TABERNERO, J.; CORTÉS, J.; PARKER, J.S.; PEROU, C.M.; BASELGA, J. Molecular features and survival outcomes of

the intrinsic subtypes within HER2-positive breast cancer. **J Nat Cancer Institute**. v. 106, n. 8, p. 152, 2014.

RAMALHO, G.C.; SILVA, M.L.C.R.; FALCÃO, B.M.R.; LIMEIRA, C.H.; NOGUEIRA, D.B.; SANTOS, A.M.; MARTINS, C.M.; ALVES, C.J.; CLEMENTINO, I.J.; SANTOS, C.S.A.B.; AZEVEDO, S.S. High herd-level seroprevalence and associated factors for bovine leukemia virus in the semi-arid Paraíba state, Northeast Region of Brazil. **Prevent Vet Med**. v. 190, p. 105324, 2021. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105324.

RAVAZZOLO, A.P.; COSTA, U.M. **Retroviridae**. In: **Eduardo Furtado Flores (Org.)**. *Virologia Veterinária*. 1ª ed. Santa Maria, 2007, p. 809-837.

ROSEWICK, Nicolas *et al.* Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2017.

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

SCHWARTZ, I.; BENSAD, A.; POLACK, B.; PERRIN, B.; BERTHELEMY, M.; LEVY, D. *In vivo* leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. **J Virol**. v. 68, n. 7, p. 4589-4596, 1994.

SCHWARTZ, I.; LEVY, D. Pathobiology of bovine leukemia virus. **Vet Res**. v. 25, n. 6, p. 521-536, 1994.

SCHWINGEL, D.; ANDREOLLA, A.P.; ERPEN, L.M.S.; FRANDOLOSO, R.; KREUTZ, L.C. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. **Sci Rep**. v. 9, n. p. 2949, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-39834-7.

SULTANOV, A.; ROLA-ŁUSZCZAK, M.; MAMANOVA, S.; RYŁO, A.; OSIŃSKI, Z.; SADUAKASSOVA, M.A.; BASHENOVA, E.; KUŹMAK, J. Molecular characterization of bovine leukemia virus with the evidence of a new genotype circulating in cattle from Kazakhstan. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 180, 2022.

THEILEN, G.H.; DUNGWORTH, D.L. Bovine lymphosarcoma in California. 3. The calf form. **Am J Vet Res**. v. 26, p. 696-709, 1965.

TSANG, J.; TSE, G.M. Molecular classification of breast cancer. **Adv Anatomic Pathol**. v. 27, n. 1, p. 27-35, 2020.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer – IARC – Global Cancer Observatory. Disponível em <<https://gco.iarc.fr>>. Acesso em 05 jan 2020.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Classification of Tumours. Breast Tumors – 5th edition. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, 2019.