

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

SHEYLA MICHELE RODAKIEWICZ

**DETERMINAÇÃO DA HETEROGENEIDADE DO VÍRUS DA
LEUCOSE BOVINA NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

LAGES, SC

2013

SHEYLA MICHELE RODAKIEWICZ

**DETERMINAÇÃO DA HETEROGENEIDADE DO VÍRUS DA
LEUCOSE BOVINA NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa

Co-orientadora: Dr^a Fabiana Forell

LAGES, SC

2013

SHEYLA MICHELE RODAKIEWICZ

**DETERMINAÇÃO DA HETEROGENEIDADE DO VÍRUS DA
LEUCOSE BOVINA NO ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora

Orientador: _____

Professor Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC
Faculdade de Medicina Veterinária

Membro: _____

Dr^a. Rejane Schaefer
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Suínos e Aves

Membro: _____

Dr^a. Simone Sionatto
Universidade Federal da Grande Dourados - Faculdade de
Ciências Biológicas e Ambientais

Lages/SC, 23 de agosto de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois “Nenhum obstáculo é grande demais quando confiamos Nele”.

A minha família, principalmente minha mãe Zélia Rodakievicz pelo apoio incondicional, amor e compreensão em todos os momentos da minha vida e por todos os ensinamentos. A minha tia Terezinha Rodakievicz, por todo amor e apoio, e a todos os meus familiares.

Ao meu noivo Cristiano Sachs, que desde a graduação esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e pelo amadurecimento e crescimento juntos.

Ao prof. Ubirajara Maciel da Costa pela orientação, amizade e apoio intelectual, durante este período de grande aprendizado.

A Dr^a Fabiana Forell pela co-orientação e por todo apoio conferido para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de mestrado e doutorado, Alais Dall Agnol, Monica Urio, Aline Schneider, Juliana Maria Almeida, Fernanda Melo, Giane Helenita Pontarolo, Camila Yamaguti Lenocho, Elvis Ticiane, Rodrigo Backes, Marcos Edgar Herkenhoff, Saulo Da Boit Goulart por toda colaboração para realização do trabalho, nos estudos e emocionalmente.

Aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Virologia – CEDIMA, principalmente Maria Luiza Fernandes, Maria Luiza Munhoz, Flávia Harumi Scheffer Yamakawa pela ajuda nas coletas e realização do trabalho.

Enfim, agradeço as minhas amigas que presentes ou distantes sempre me ajudaram em momentos de dificuldade e compartilharam também momentos de alegria, Ana Paula Alves Monteiro, Aline Schneider, Caroline Porto e Maria Luiza Fernandes.

E a UDESC pela oportunidade única a mim dispensada e a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

RODAKIEWICZ, Sheyla Michele. **Determinação da heterogeneidade do vírus da leucose bovina no estado de Santa Catarina.** 2013. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

O vírus da Leucose Bovina (BLV) membro da família *Retroviridae*, gênero *Deltaretrovirus*, é um agente importante em bovinos, sendo responsável por perdas econômicas principalmente em rebanhos leiteiros, podendo causar prejuízos em torno de 10% na produção. A infecção pelo BLV, pode manifestar-se de duas formas, uma benigna, que atinge aproximadamente 30% dos animais infectados, cursando com linfocitose persistente, e a forma maligna, muitas vezes fatal, que atinge aproximadamente 5% dos animais, com surgimento de tumores linfóides (linfossarcomas). Atualmente, vários estudos têm sido realizados a cerca dos genótipos do BLV, encontrando-se pelo menos sete genótipos, em amostras de diferentes locais do mundo. O presente estudo teve como objetivo, a genotipagem do BLV, em rebanhos leiteiros do estado de Santa Catarina. Foram coletadas 454 amostras de sangue de bovinos leiteiros de 31 propriedades e quatro búfalos sendo realizada inicialmente a sorologia pelo teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Coletaram-se também amostras de tumores com diferentes localizações: linfonodo, coração, intestino e musculatura próximo ao coxal, de três bovinos. Após a sorologia 191 amostras foram constatadas como soropositivas sendo submetidas então à extração de DNA e em 62 amostras realizou-se a reação da polimerase em cadeia (PCR), visando a amplificação de um fragmento 440 pb do gene *env*, assim como nas amostras de tumores. Dezenove amostras extraídas de sangue e dos tumores foram submetidas à análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), através da digestão do fragmento da PCR por

cinco endonucleases de restrição, *Bam*HI, *Hae*III, *Tru*9I, *Taq*I e *Mwo*I. Os resultados obtidos na sorologia demonstraram 42% dos soros dos bovinos analisados positivos (191/454), 68% de propriedades positivas (21/31), nenhum soro bubalino positivo e as amostras de tumores foram positivas em sua totalidade na PCR. Nas análises por RFLP identificamos cinco perfis diferentes correspondendo a cinco genótipos circulantes no Estado. Dentre os genótipos encontrados neste trabalho, o mais prevalente foi o genótipo X (47,4%). Este estudo permitiu conhecer alguns dos genótipos virais presentes em bovinos no Estado de Santa Catarina sendo estes resultados úteis para futuros estudos epidemiológicos, assim como identificar a existência de novas variantes circulantes e sua prevalência.

Palavras-chave: BLV. Deltaretrovírus. Bovinos leiteiros. *env.* RFLP.

ABSTRACT

RODAKIEWICZ, Sheyla Michele. **Determination of the heterogeneity among bovine leukemia virus from Santa Catarina State**. 2013. 72f. Dissertation (MSc in Animal Science) - University of the State of Santa Catarina. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2013.

Bovine leukemia virus (BLV) is a member of the family *Retroviridae*, genus *Deltaretrovirus* and it is an important agent, being primarily responsible for economic losses in dairy herds, causing losses of around 10% in production. The infection of BLV, can manifest itself in two ways, benign one, which reaches approximately 30% of the animals infected with concomitant persistent lymphocytosis and malignant condition, often fatal, affecting approximately 5% of animals with tumor appearance lymphoid (lymphosarcomas). Currently, several studies have been made about of BLV genotypes, finding at least seven genotypes, in samples of different parts of the world. The aim of this study was the molecular characterization of samples of BLV from seropositive dairy cattle in Santa Catarina State. Were collected 454 blood samples of dairy cattle of the 31 properties and four buffaloes, being initially performed serology using agar gel immunodiffusion test (IDGA). Also collected tumor samples with different locations: lymph node, heart, intestine and muscle near the coxal, from three cattle. After serology 191 samples were found to be seropositive then submitted to DNA extraction and in 62 samples were performed the polymerase chain reaction (PCR) for amplification of a 440 bp fragment of the *env* gene, as well as the tumor samples. Nineteen samples extracted from blood and tumors samples were submitted to restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) by digestion of the PCR fragment for five restriction endonucleases, *Bam*HI, *Hae*III, *Tru*9I, *Taq*I and *Mwo*I. The results obtained in serology demonstrated 42% seropositive animals (191/454) and 68% positives properties

(21/31), buffaloes no positive and tumor samples were positive in its entirety in PCR. In RFLP analysis identified five different profiles corresponding to five genotypes circulating in the State. Among the genotypes found in this study, the highest prevalence was observed genotype X (47.4%). This study allows us to know some the viral genotypes present in cattle in the Santa Catarina state and these results useful for future epidemiological studies, as well as identify the existence of new variants and their current prevalence.

Keywords: BLV. Deltaretrovirus. Dairy cattle. *env*. RFLP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Porcentagem de animais soropositivos nas diferentes .. mesorregiões de Santa Catarina.....44
- Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo demonstrando a amplificação do fragmento de 440 pb do gene *env* das amostras 1 e 2 ... pela técnica de PCR.....45
- Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose a 3,5% corado com brometo de etídeo demonstrando a digestão com as enzimas de restrição do fragmento de 440 pb do gene *env* do BLV. O genótipo identificado nesta amostra foi o IX.....47
- Figura 4 - Prevalência dos genótipos virais entre os animais ..testados pela na análise RFLP.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reação de digestão para as enzimas de restrição utilizadas	42
Tabela 2 - Dados gerais sobre a quantidade de amostras, regiões de coleta, análises realizadas e resultados obtidos.....	43
Tabela 3 - Produtos gerados pela clivagem do fragmento de 440 pb do gene <i>env</i> do BLV com as enzimas de restrição.....	46
Tabela 4 - Predominância dos genótipos virais de acordo com as mesorregiões do estado de Santa Catarina.....	49
Tabela 5 - Genótipos do BLV encontrados em tumores localizados em diferentes regiões.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLV	Bovine leukemia virus/ vírus da leucose bovina
FLK	Células fetais de fígado ovino
GP	Glicoproteína
HTLV	Vírus T linfotrópico humano
LEB	Leucose Enzoótica Bovina
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
RFLP	Análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição
µg	Micrograma
mL	Mililitro
U	Unidade
µL	Microlitro
pb	Pares de base
nm	Nanômetro
M	Molar
mM	Milimolar
v	Volts
mA	Mili Amperes
µL	Microlitros
g	Gramas
<i>g</i>	Força gravitacional
mL	Mililitro
°C	Graus celsius
mm	Milímetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E GENÔMICAS DO BLV.....	15
2.2 CLASSIFICAÇÃO DO BLV.....	16
2.3 EPIDEMIOLOGIA DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA	16
2.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	17
2.5 PATOGENIA E SINTOMATOLOGIA	19
2.6 TRANSMISSÃO	20
2.6.1 Transmissão vertical	20
2.6.2 Transmissão horizontal.....	21
2.7 DIAGNÓSTICO.....	22
2.8 CONTROLE	24
2.9 PREVALÊNCIA DA LEUCOSE EM BOVINOS	24
2.10 VARIABILIDADE GENÔMICA	26
2.11 GENOTIPAGEM DO BLV	29
3 CAPÍTULO ÚNICO – ARTIGO	33
3.1 INTRODUÇÃO.....	36
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.2.1 Coleta de amostras	37
3.2.2 Preparação das amostras	38
3.2.3 Sorologia por imunodifusão em gel de ágar (IDGA)	39
3.2.4 Extração de DNA	39
3.2.5 Amplificação do gene <i>env</i> do BLV por PCR	40
3.2.6 Análise dos produtos da PCR pela análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP).....	41
3.3 RESULTADOS.....	42
3.3.2 Sorologia para Leucose Enzoótica Bovina	43
3.3.3 Detecção do provirus do BLV pela técnica da PCR.....	45
3.3.4 Classificação do BLV pela análise RFLP dos produtos da PCR do gene <i>env</i>.....	45
3.3.5 Prevalência dos genótipos virais pela análise RFLP... 	47
3.3.6 Relação dos genótipos com as mesorregiões analisadas	48

3.3.7 Relação entre os genótipos virais e os tumores analisados.....	49
3.4 DISCUSSÃO.....	50
3.5 CONCLUSÕES	54
3.6 REFERÊNCIAS ARTIGO	54
4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	60
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	69

INTRODUÇÃO

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB), cujo agente etiológico é o vírus da Leucose Bovina, é responsável por duas manifestações clínicas, a linfocitose persistente e o linfossarcoma que é a forma maligna e geralmente fatal.

A LEB possui grande importância principalmente em bovinos leiteiros, encontrando-se distribuído mundialmente, com prevalência variando entre os rebanhos.

A sua importância econômica decorre de diversos fatores, como o descarte de animais prematuramente, devido a presença dos linfossarcomas, condenação de carcaças, queda na produção de leite, podendo chegar até 10%, custos com o diagnóstico e tratamento dos animais acometidos, dentre outros. Futuramente, pode ainda ser considerado como possível barreira para o comércio nacional e internacional de animais e de material genético oriundos de bovinos.

Diversos trabalhos tem sido desenvolvidos a cerca da prevalência do BLV. Em estudo prévio realizado no laboratório Cedima – CAV - UDESC, 29% (93/321) dos animais testados foram considerados soropositivos ou seja, apresentaram anticorpos contra o BLV pelo teste de imunodifusão em ágar (IDGA).

Tendo em vista a alta prevalência do BLV circulante no Estado e a alta variabilidade dos retrovírus fazem-se necessários estudos mais aprofundados a cerca desse assunto. Alguns trabalhos citam que a variabilidade genética do vírus deve-se a mutações, a maioria pontuais, levando a possíveis substituições de aminoácidos da glicoproteína de superfície (gp51). Em virtude destas variações que ocorrem no gene que codifica a gp51, vários estudos tem sido feitos para identificar os genótipos do BLV existentes, através da análise RFLP e filogenética.

Em decorrência da falta de informação a cerca dos genótipos do BLV circulantes nos rebanhos leiteiros do Estado de Santa Catarina, o presente estudo teve como objetivo avaliar a existência de diferentes genótipos do BLV nestes rebanhos, determinar a prevalência dos diferentes genótipos virais e montar um perfil do BLV no Estado, podendo assim rastrear as infecções

causadas pelo vírus e fornecer subsídio para que se desenvolvam estratégias efetivas de controle e prevenção para cada genótipo viral.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E GENÔMICAS DO BLV

Os *Retrovirus* tem o genoma constituído por duas moléculas de RNA fita simples de polaridade positiva, sendo mais propensos a mutações do que os vírus com genoma DNA (CANN, 2005). O genoma do BLV é constituído por aproximadamente 8714 nucleotídeos e a organização do genoma é 5' - LTR – gag – pol – env – pXBL – 3' (ABDAHNE et al., 2012). O gene *gag* codifica a proteína de matriz, nucleoproteína e proteína do capsídeo. O gene *pol* codifica as enzimas transcriptase, integrase, protease e o gene *env* codifica as proteínas do envelope, transmembrana e de superfície (RAVAZZOLO; COSTA, 2007).

São virions envelopados, esféricos, com tamanho entre 80 e 120 nm. Sua estrutura é composta por um núcleo, formado pelo genoma viral condensado com as nucleoproteínas e outras proteínas (protease, transcriptase reversa, integrase); capsídeo, formado por associação de cópias das proteínas do capsídeo e o nucleocapsídeo (núcleo + capsídeo), revestido externamente por uma camada formada por cópias das proteínas de matriz. Essa camada é recoberta por um envelope lipoprotéico, onde estão ancoradas as glicoproteínas de superfície e transmembrana. Uma característica importante é a presença da enzima transcriptase reversa, que possibilita a transcrição do genoma viral composto por RNA em DNA proviral, sendo este por sua vez incorporado ao genoma da célula infectada, caracterizando assim uma infecção persistente (RAVAZZOLO; COSTA, 2007).

As proteínas do envelope tem papel importante na infectividade do vírus, sendo elas a transmembrana gp30 e a de superfície gp51, encontrando-se esta última ancorada no envelope viral, ligada covalentemente ou não a glicoproteína transmembrana. Estas glicoproteínas possuem ligação de dissulfetos quando expressas em grandes quantidades nas células e derivam de uma clivagem de um precursor (gpr72) por uma endoprotease dibásica celular. As ligações de dissulfetos

possuem papel importante nas mudanças conformacionais que ocorrem durante a ligação ao receptor celular e o início do processo de fusão do vírus com a célula do hospedeiro (JOHNSTON; RADKE, 2000).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DO BLV

O vírus da leucose bovina pertence ao gênero *Deltaretrovirus* da família *Retroviridae*, apresentando similaridades no seu genoma, estrutura e patogenicidade com o vírus T linfotrópico humano tipo 1 e 2 (TOSTES, 2005).

Segundo Loughran (1996), o BLV faz parte do gênero tipo C dos retrovírus, sendo os membros deste grupo caracterizados pela presença de um epítopo conservado nas proteínas do núcleo, que são ausentes em outros retrovírus. Outra característica importante na patogênese viral é uma única região do gene *pX*, localizada entre o gene *env* e a região longa terminal repetida 3' (LTR), codificando a proteína Tax, responsável por ativar os genes virais e do hospedeiro.

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

Tostes (2005) cita através da sua revisão que foram observadas diversas formas clínicas da Leucose Bovina, mas só uma forma era transmissível, causada pelo BLV, sendo denominada de Leucose Enzoótica Bovina. As demais formas foram agrupadas sob o nome de Leucose Esporádica Bovina, cursando com três formas principais: juvenil, tímica e cutânea, e cuja etiologia ainda permanece desconhecida.

Segundo Leuzzi Jr. et al. (2001), a Leucose Enzoótica Bovina é uma doença de distribuição mundial e sua prevalência varia amplamente entre os rebanhos, sendo maior em gado leiteiro do que em gado de corte. A doença foi descrita pela primeira vez na Alemanha, no ano de 1871 e no Brasil em 1943, sendo introduzida provavelmente através da importação de animais. Inicialmente, foram importados reprodutores de alto valor zootécnico dos Estados Unidos e Canadá e na década de

70 houve uma grande introdução de animais advindos do Uruguai (MORAES et al., 1996).

Atualmente, animais importados de forma oficial, são submetidos obrigatoriamente a testes sorológicos, sendo aceitos somente os animais constatados como negativos nestes testes. Porém, ainda hoje existe a introdução de animais de forma ilegal, principalmente através de fronteiras de países vizinhos sem fiscalização, representando um grande risco na difusão desta enfermidade (MORAES et al., 1996).

A infecção natural pelo BLV ocorre em outras espécies além dos bovinos, sendo estas, zebuínos, bubalinos e também capivaras, apesar de ser possível infectar experimentalmente também ovinos e caprinos (TOSTES, 2005). Em bovinos, o BLV causa uma infecção persistente, sendo responsável por perdas econômicas significativas (MORAES et al., 1996). Em bubalinos, Chaves et al. (2012) descrevem a prevalência como de baixa intensidade.

Algumas características da população em geral, estrutura da propriedade e aspectos individuais do rebanho são importantes para se entender a epidemiologia da Leucose Enzoótica Bovina. O fato desta enfermidade ser mais prevalente em gado de leite do que em gado de corte, pode ser explicado pelo confinamento e pela média de idade maior do rebanho leiteiro e não há diferença na prevalência entre raças leiteiras. Há um aumento na prevalência da infecção com o avançar da idade, estabilizando em animais mais velhos, não havendo diferença entre os sexos. Rebanhos maiores ou que apresentem casos de linfoma tendem a ter uma prevalência mais alta da infecção e não havendo aparentemente diferença de prevalência entre as estações do ano (TOSTES, 2005).

2.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O Brasil atualmente ocupa o 6º lugar entre os países tidos como maiores produtores de leite, ultrapassando 25 bilhões de litros de leite produzidos ao ano. Minas Gerais é o maior estado produtor, portanto, a redução na produção de leite

decorrente da infecção pelo BLV, afeta principalmente a indústria leiteira e também o setor agropecuário (RAJÃO, 2008).

A perda econômica em rebanhos leiteiros é significativa, onde a queda na produção de leite pode ser 10% menor quando comparado ao rebanho saudável (TOSTES, 2005).

Em trabalho realizado por Rajão (2008), amostrando 158 fêmeas bovinas em lactação, das raças Holandês pura com média de produção de 5.000kg de leite e mestiça Holandês/Zebú, com média de produção de 3.000kg de leite, foram comparados dados de produção e reprodução entre as duas raças. Observou-se que fêmeas Holandesas puras infectadas apresentaram produção de leite inferior quando comparada a produção das fêmeas não infectadas. A redução de 10% por lactação pode ser resultante da infecção pelo vírus nas células da glândula mamária, resultando em menor produção de caseína por essas células. As fêmeas mestiças infectadas apresentaram produção de leite superior as negativas, isto pode ter sido ocasionado pela idade mais elevada e maior resistência ambiental desses animais, não estando relacionado com a infecção pelo BLV. Quanto aos parâmetros reprodutivos, não houve diferença entre as fêmeas infectadas e não infectadas. Porém, estudos demonstram uma diminuição na taxa de concepção de 7% em animais soropositivos quando comparados com animais soronegativos (OIE, 2012).

Existem ainda outros fatores de grande impacto econômico decorrentes da Leucose Bovina, como perdas na exportação para mercados que requerem animais soronegativos; perdas decorrentes de custos com o diagnóstico e o tratamento das complicações acarretadas pelos linfossarcomas; redução na produtividade devido ao comprometimento do sistema imunológico; morte ou descarte prematuro de animais de alto potencial genético, decorrente da imunossupressão e conseqüentemente a ocorrência de infecções secundárias e condenação de carcaças em frigoríficos com serviço de inspeção veterinária. Estes fatores associados à infecção pelo BLV, aumentam os prejuízos econômicos determinados por esta enfermidade (TRAININ et al., 1996; LEUZZI JR. et al., 2001).

2.5 PATOGENIA E SINTOMATOLOGIA

O BLV infecta linfócitos sanguíneos e células tumorais, encontrando-se como provírus integrado no genoma dessas células e pode ser encontrado na porção celular de diversos fluidos corporais (MATSUMURA et al., 2010).

Segundo Luders (2001) a infecção pelo BLV, inicia-se primeiramente através da interação da gp51 a um receptor de superfície do linfócito B, sendo estas as principais células alvo. Após a adsorção viral, ocorrem mudanças conformacionais levando a fusão do envelope viral com a membrana celular, ocorrendo então a entrada do material genético viral na célula, digestão do capsídeo, síntese do DNA proviral, integração do provírus no genoma do hospedeiro e expressão dos genes e produção das proteínas virais (ZHAO; BUEHRING, 2007).

Os bovinos infectados apresentam anticorpos detectáveis no soro apenas oito semanas após o início da infecção, apresentando-se assintomáticos por este período, sendo porém importantes disseminadores do vírus (LEUZZI JR. et al., 2001).

A infecção pelo BLV promove alteração do sistema imune do hospedeiro a nível celular com aumento de linfócitos B e diminuição de linfócitos T, principalmente CD4+ e humoral (TRAININ et al., 1996), em decorrência do desenvolvimento de uma resposta imunológica exacerbada com permanente produção de anticorpos contra a glicoproteína de envelope, codificada pelo gene *env* (BALIC et al., 2012).

Dos animais infectados, cerca de 30% podem desenvolver linfocitose persistente (LP) que é o aumento dos linfócitos circulantes, neste caso os linfócitos B e apenas 2 a 5% poderão desenvolver linfossarcomas (LEUZZI JR. et al., 2001; RAJÃO, 2008).

O desenvolvimento dos tumores possui um curso fatal, com a morte do animal ocorrendo entre três e seis meses após o início dos sinais clínicos (TRAININ et al., 1996).

Segundo dados da OIE (2012), a suscetibilidade dos animais a desenvolverem linfocitose persistente e linfossarcoma é determinada geneticamente.

Os principais órgãos afetados pelo BLV através da forma de linfossarcoma são os linfonodos, porém outros órgãos também podem ser afetados, como: abomaso, coração, útero, tecido periorbital e medula espinhal (LUDERS, 2001).

Os principais sinais clínicos observados são queda na produção de leite, falta de apetite, geralmente causado por um crescimento neoplásico na faringe, dificultando a capacidade de deglutição levando a perda de peso, problemas de abomaso e lesões na medula espinhal, ocasionando a paralisia dos membros posteriores (STOKKA et al., 1998).

Os linfonodos periféricos e internos apresentam-se aumentados de tamanho podendo ser palpados sob a pele e através de exame retal. Na necropsia, os linfonodos e demais tecidos afetados encontram-se infiltrados por células neoplásicas (OIE, 2012).

2.6 TRANSMISSÃO

A transmissão do BLV pode ocorrer por contato com animais infectados através de secreções e excreções, através do parto (transmissão vertical), através de insetos (mecânica), por transfusão sanguínea, uso comum de agulhas em vacinação em massa ou administração de medicamentos (horizontal), dentre outros (MATSUMURA et al., 2010).

De acordo com Stokka et al. (1998), apenas 0,0005 mL de sangue são suficientes para o BLV infectar animais saudáveis.

2.6.1 Transmissão vertical

Somente a transmissão *in útero* e a ingestão de colostro e leite foram comprovadas como infectantes à prole. Entretanto, um estudo realizado para avaliar a prevalência de anticorpos contra o BLV no soro de bezerros antes da ingestão do colostro, nascidos de mães soropositivas, ou seja, avaliar a transmissão uterina do BLV, em dois rebanhos leiteiros em Michigan, demonstrou que 4,7% dos bezerros nascidos de fêmeas soropositivas foram positivos antes da ingestão do colostro no

primeiro rebanho e 3,4% no segundo rebanho. Através deste estudo pode-se observar que a transmissão via uterina do BLV é muito baixa, quando comparada com outras formas de transmissão (JACOBSEN et al., 1983).

Visto que o BLV pode ser transmitido verticalmente através do leite e do colostro, investigou-se a presença do vírus em células epiteliais mamárias por imunohistoquímica e PCR, constatando-se evidências antigênicas ou moleculares do BLV nas células de 20, dos 28 animais testados. Estes resultados segundo os autores sugerem que, o BLV é capaz de infectar e expressar antígenos virais, *in vivo*, no epitélio glandular mamário e possui um amplo tropismo pelas células mamárias (BUEHRING et al., 1994).

2.6.2 Transmissão horizontal

Segundo Tostes (2005), a forma horizontal de transmissão é responsável pela maior parte das infecções em bovinos. As principais formas de transmissão são a iatrogênica, em procedimentos como descorna, tatuagem, vacinação e transfusão sanguínea com o uso de instrumentos contaminados com sangue infectado, e o contato direto entre os animais, através de secreções e excreções, como saliva, urina, secreção nasal e traqueal.

De acordo com experimento realizado por DiGiacomo et al. (1985), com bezerros holandeses, observou-se através de IDGA, que a prevalência do BLV três meses após a descorna foi significativamente maior no grupo em que este procedimento foi realizado quando comparado ao grupo controle, concluindo assim que o material utilizado na descorna poderá ser uma fonte de infecção do BLV, quando não esterilizado após o procedimento.

Manet et al. (1989), através de testes sorológicos sequenciais de três regiões diferentes da França, observaram haver correlação geográfica entre a taxa de incidência da infecção pelo BLV e a densidade de insetos hematófagos, assim como variações sazonais, sendo a taxa maior no verão do que no inverno. A incidência observada do BLV foi de 9,6% entre os

três rebanhos. Estes dados, indicam que os tabanídeos tem papel importante na disseminação do BLV entre os rebanhos.

Foi avaliado em experimento realizado por Divers et al. (1995), o risco da transmissão do BLV através de exame de palpação retal em um rebanho comercial da raça holandesa, por um período de 22 meses. Pode-se constatar que vacas palpadas sem a mudança de luva tiveram uma chance quase três vezes maior de se infectarem, confirmando assim, que a palpação retal pode ser um importante fator de risco na transmissão do BLV e deve ser considerado na elaboração de um programa de controle da LEB.

A transmissão do BLV pela monta natural também pode ocorrer, pela transferência de sangue em decorrência da cópula (STOKKA et al., 1998). Outros estudos realizados para avaliar a transmissão do BLV através de sêmen, óvulos ou embriões de gado infectado indicaram não haver nenhuma correlação (TOSTES, 2005).

2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LEB é fundamental para o controle e a posterior erradicação da doença (TOSTES, 2005).

O diagnóstico clínico pode ser feito através dos sinais clínicos observados, porém é presuntivo. Pode ser realizado também diagnóstico histopatológico através de fragmentos dos órgãos afetados (LUDERS, 2001).

Segundo Leuzzi Jr. et al. (2001), o principal objetivo dos métodos sorológicos é a identificação de bovinos infectados com o BLV e não o diagnóstico das formas clínicas da doença que são a linfocitose persistente e linfossarcoma. As técnicas comumente utilizadas são a imunodifusão em gel de ágar (IDGA), que é o teste padrão, recomendado pela OIE, por possuir alta especificidade, ser viável e acessível e que consiste na detecção de anticorpos contra o BLV. O ensaio imunoenzimático (ELISA) é mais sensível que o IDGA e pode ser utilizado para amostras de leite, e o radioensaio (RIA), utilizado para identificação individual por ser um dos testes mais sensíveis para a detecção de anticorpos em animais expostos

até duas semanas e pode também ser utilizado para amostras de leite (TOSTES, 2005).

Inicialmente, o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular foi impossibilitado pela inexistência de linhagens celulares que permitissem a replicação do BLV *in vitro*, porém a partir da década de 70, conseguiu-se a replicação deste vírus em células FLK e o desenvolvimento de uma linhagem de células pulmonares de morcego que possibilitou a replicação do BLV. A partir daí surgiram outras técnicas como o teste de indução de formação de sincício, utilizado em cultura de células infectadas com o BLV e que visa averiguar a habilidade da gp51 em induzir a fusão celular (LEUZZI JR. et al., 2001), e outras técnicas a nível molecular, como a PCR, utilizada para a detecção precoce do vírus, porém ainda sem aplicação clínica, devido ao custo elevado e a grande variabilidade do BLV (TOSTES, 2005).

Camargos et al. (2003), realizaram um trabalho com o objetivo de desenvolver uma técnica de PCR para identificação do BLV em amostras de sangue de bovinos, assim como determinar a sensibilidade e especificidade da técnica e comparar com o teste de IDGA, utilizado atualmente como teste padrão para a detecção do BLV. Os resultados observados foram que a sensibilidade da PCR deve ser melhorada e a baixa especificidade diagnóstica, deve ter ocorrido devido não pelos resultados falsos positivos obtidos na PCR, mas provavelmente por detectar animais recentemente infectados o que não ocorre na IDGA. A concordância observada entre os dois testes foi de 73,8%. A sensibilidade diagnóstica obtida foi de 0,87 e a especificidade diagnóstica 0,62. Constatou-se assim que a PCR pode ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico complementar a IDGA atualmente utilizada, mas para isto sua sensibilidade deve ser melhorada.

Embora o alto custo da PCR faça com que a técnica não seja empregada como teste de rotina para a detecção do BLV, este tem sido um método muito utilizado em experimentos realizados por diversos autores como Kettmann et al. (1980), que constataram, através da extração de DNA do timo de animais com linfocitose persistente e outros com a presença de tumores, que o provírus do BLV não é detectado em linfócitos de bovinos

soropositivos e que sejam assintomáticos, indicando assim que menos de 5% da população de linfócitos abriga o genoma viral.

2.8 CONTROLE

Atualmente não existe nenhuma vacina e nem tratamento antiviral efetivo contra o BLV, assim para evitar a sua disseminação em um rebanho, devem ser tomadas algumas medidas de prevenção e controle como: controle de insetos, uso de luvas individuais na palpação retal de vacas, desinfecção de equipamentos para procedimentos cirúrgicos, utilização de agulhas e seringas individuais, evitar o ingresso de animais infectados no rebanho e realizar um controle efetivo dos animais positivos (TOSTES, 2005).

O ideal seria que os animais fossem separados totalmente em lotes infectados e livres do BLV, pois a eliminação dos animais soropositivos muitas vezes é inviável, principalmente para pequenos produtores (LEUZZI JR. et al., 2001).

2.9 PREVALÊNCIA DA LEUCOSE EM BOVINOS

Visto que a Leucose Enzoótica Bovina é uma doença altamente disseminada e que esta é altamente prevalente em rebanhos bovinos de aptidão leiteira, muitos estudos tem sido feitos a cerca da prevalência desta doença.

Entre 1980 e 1989, D'Angelino et al. (1998), realizaram um estudo sobre a epidemiologia do BLV no Brasil, em vacas holandesas, provenientes de uma fazenda leiteira no estado de São Paulo, onde obteve-se a prevalência de 54% e esta prevalência aumentou quanto maior a idade dos animais. Bezerros com menos de 180 dias de idade, tiveram um decréscimo na prevalência do BLV, do nascimento até os 120 dias de idade, fato que pode ser explicado pela interferência da imunidade materna, porém após este período a prevalência observada aumentou. Outro fato importante foi a prevalência maior em animais importados o que pode indicar que estes animais tiveram um papel importante na disseminação desta

enfermidade no Brasil, como citado por outros autores a introdução de animais importados do Uruguai na década de 70.

De acordo com Cordeiro et al. (1994), realizando cinco testes sorológicos (IDGA) ao longo de três anos em bovinos das raça Holandês e Jersey pertencentes a EPAGRI - Estação Experimental de Itajaí, observaram uma prevalência de 35% desta enfermidade no rebanho. Conforme os animais foram sendo constatados como soropositivos através do IDGA, estes foram sendo eliminados do rebanho, podendo-se observar assim que a eliminação dos animais soropositivos foi uma prática adequada para erradicar o BLV do rebanho, pois após o 3º teste, não haviam mais animais soropositivos. Observaram ainda, que a utilização do IDGA como método diagnóstico foi eficiente para identificar animais infectados pelo BLV, mas para se identificar todo os animais soropositivos do rebanho, foram necessários pelo menos três testes.

Moraes et al. (1996) analisaram animais de nove regiões do estado do Rio Grande do Sul, onde através do teste de IDGA observaram a prevalência de 29,1% das propriedades e 12% dos animais. Observou-se ainda que a prevalência foi maior em animais com idade acima de 11 anos e em animais da raça Jersey quando comparado a animais de outras raças, como Holandês e sem raça definida.

Em estudo realizado por Carvalho et al. (1996), pesquisaram a prevalência da Leucose Enzoótica Bovina, em Londrina, Paraná, através do teste de IDGA. Obtiveram como resultados, a prevalência de 35,7% das propriedades avaliadas com animais soropositivos e dos bovinos e zebuínos analisados 7% foram positivos para o BLV. Quando analisou-se separadamente bovinos e zebuínos, observou-se a prevalência de 18,4% para os bovinos da raça Holandesa Preto e Branca e nenhum dos animais zebuínos da raça Nelore foram soropositivos. A prevalência em propriedades leiteiras foi de 83,3%, sendo maior, em rebanhos mais tecnificados, onde os animais encontram-se mais confinados e passam por diversos procedimentos que são fontes de transmissão do agente. Observou-se ainda que em animais com mais de 60 meses de

idade a prevalência foi maior, 36,6%, quando comparada com faixas etárias inferiores.

Os resultados obtidos por Luders (2001) ao testar 250 fêmeas, com mais de dois anos de idade, sendo estas da raça holandesa e cruzas em 129 propriedades leiteiras de Mafra-SC, demonstraram que a prevalência entre as propriedades testadas foi de 10,8% e dos 250 soros testados 7,6% apresentaram anticorpos.

Segundo Monti et al. (2005), dos animais testados 70% foram positivos na técnica de PCR, enquanto que 90% desses animais foram positivos também em testes sorológicos pareados e 7% dos animais analisados apresentaram resultado negativo na sorologia e positivo na PCR, provavelmente tratando-se de animais recentemente infectados, não sendo os anticorpos ainda detectados no teste sorológico.

Dos 158 animais avaliados por Rajão (2008) em três rebanhos leiteiros de Minas Gerais, através de IDGA, a prevalência de animais soropositivos foi de 79,7% e dos animais soronegativos, 20,3%.

Outro estudo com o intuito de avaliar a prevalência da Leucose realizado no ano de 2007 por Barros Filho et al. (2009), em cinco propriedades da região metropolitana de Curitiba, detectou através do teste de IDGA, 56,3% de animais positivos para o BLV. Estes autores ainda confrontaram estes resultados com outros encontrados por outros autores e afirmaram que com o passar dos anos houve um aumento do número de animais infectados no Brasil e também no estado do Paraná, confirmando assim que esta doença é altamente disseminada entre os rebanhos.

2.10 VARIABILIDADE GENÔMICA

Assim como outros vírus RNA, o genoma dos retrovírus também está sujeito a sofrer mutações, em proporção maior do que ocorre nos vírus DNA, decorrentes da limitada fidelidade da polimerase viral e a ausência de mecanismos de correção de erros durante a replicação viral (WILLEMS et al., 1993) ocorrendo essas mutações em uma taxa de 10^3 a 10^4

nucleotídeos incorporados por ciclo de replicação. Esses eventos ocorrem como uma forma de adaptação das novas gerações virais, estando relacionados também com a capacidade de gerar variantes antigênicas que podem escapar da resposta imune do hospedeiro (CANN, 2005).

Pequenas alterações na estrutura viral podem alterar a patogenia viral (infectividade, disseminação e progressão da Leucose), patogenia celular e o tropismo (CAMARGOS et al., 2007; JULIARENA et al., 2013).

Rodriguez et al. (2009), observaram que a variação molecular do BLV afetou principalmente sequências de nucleotídeos, sendo a maioria das substituições de aminoácidos, observadas na glicoproteína de superfície (gp51), localizando-se em sítios alvos de anticorpos o que sugere que essas mutações no gene *env* podem estar relacionadas com a resposta imune do hospedeiro.

Mamoun et al. (1990), analisaram a variabilidade de nucleotídeos do gene *env* de sete isolados do BLV de diferentes regiões geográficas e observaram que ao contrário do gene *env* de outros lentivírus, a variabilidade do BLV é limitada, sendo menor que 6%, assemelhando-se ao vírus T linfotrópico de humanos. A maioria das substituições de nucleotídeos são conservativas, onde de 515 aminoácidos da gp72, somente 22 foram alterados. A variabilidade da gp35 que é a glicoproteína transmembrana é limitada a seis aminoácidos, sendo três localizados no polipeptídeo externo, sendo que essas modificações, promovem pequenas alterações na estrutura da molécula. A variabilidade epitópica de aminoácidos da gp51, refletem a exposição da glicoproteína na superfície viral a ação do sistema imune do hospedeiro, sendo composta por duas regiões variáveis (do aminoácido 34 ao 121), contendo os epítomos conformacionais F, G e H e duas regiões altamente conservadas (entre os aminoácidos 122 e 234 e 255 e 301), relacionadas com as funções biológicas do vírus.

Segundo Sagata et al. (1985), o BLV possui homologia de 45% com o HTLV tipo B e D, 29% com o vírus aviário tipo C e 25% quando comparado com o vírus de mamífero tipo C. Como o HTLV e BLV tem baixa divergência entre si e possuem alta

divergência quando comparados com outros membros do gênero C dos retrovírus, estes autores propuseram que estes dois vírus deveriam fazer parte de um outro grupo, denominado tipo “E” da subfamília *Oncovirinae*.

Um trabalho realizado por Licursi et al. (2003), visando investigar possíveis modificações do genoma do BLV em bovinos da Argentina e Japão, observou nas amostras Argentinas 25 substituições de nucleotídeos sendo estas mutações pontuais, ocorrendo em sete posições do fragmento de 400 pb do gene *env*.

Para Mamoun et al. (1990), as variantes do BLV podem ser classificadas em dois grupos, com média de variabilidade entre eles de 3,5% e um terceiro grupo com os genótipos Europeus, distante dos demais genótipos.

De acordo com experimento realizado por Camargos et al. (2007), a maioria das substituições de nucleotídeos observadas foram mutações silenciosas, ocorrendo principalmente a troca de G para A e C para T. A região mais conservada foi uma que codifica o peptídeo sinal e a menos conservada, a que codifica a glicoproteína gp51, sendo que a maioria das mudanças de aminoácidos e nucleotídeos foram encontradas próximo da região carboxi terminal da gp51 e nenhuma das alterações observadas localizaram-se em regiões com função biológica importante.

Para Willems et al. (1993), a taxa de mutação estimada para a região LTR foi de 0,034% por ano, enquanto que para 16 sequências analisadas do gene *env* observou-se a taxa de 0,009% ao ano, sendo essas mutações pontuais. Esta baixa variabilidade pode ser explicada pelo limitado número de ciclos de replicação do BLV durante o curso da infecção.

Em estudo realizado por Hemmatzadeh (2007), em bovinos de 40 propriedades leiteiras do Irã, observou-se uma variabilidade entre os isolados de 0,003 a 4,5%, sendo estas variações, substituições de nucleotídeos.

As substituições de aminoácidos observadas por Moratorio et al. (2010), na proteína gp51 de isolados de BLV da América do Sul, localizaram-se expostos na superfície do segundo epítopo de neutralização da proteína gp51. Foi

observada ainda uma substituição importante em isolados do Uruguai e Brasil, na posição 134 do ácido aspártico (D) por uma asparagina (N) e observou-se ainda a substituição de fenilalanina (F) por serina (S) na posição 146 da gp51. Isolados da Argentina e alguns do Brasil também apresentaram alteração do N por D na posição 141.

Zhao e Buehring (2007) analisaram 44 sequências completas do gene *env* do BLV e observaram que a variabilidade de nucleotídeos encontrada variou de 0,064% a 4%, com média de 1,6%, enquanto que para 28 isolados recém sequenciados, a variabilidade foi também de 0,064% a 4%, com média de 1,5%.

Para o melhor entendimento do BLV e de sua variabilidade são necessários ainda mais estudos principalmente sobre a evolução viral, variabilidade e características biológicas do vírus (CAMARGOS et al., 2007).

2.11 GENOTIPAGEM DO BLV

A genotipagem pela análise RFLP baseia-se na sequência parcial do genoma e vem sendo utilizada com bastante frequência, por fornecer uma idéia geral da composição do genoma viral (ZHAO; BUEHRING, 2007).

O genoma completo do BLV é composto por 8.714 pb, enquanto que o gene *env*, utilizado na maioria dos estudos de genotipagem pela sua alta variabilidade é composto por 1.547 pb, compreendido entre as posições 4821 e 6368 (SAGATA et al., 1985).

O sequenciamento e a filogenia são úteis para a caracterização do BLV, tendo em vista que sorologicamente não se consegue diferenciar os isolados existentes (HEMMATZADEH, 2007).

Inoue et al. (2011) avaliaram 214 linfossarcomas em bovinos das raças Holandês, Japonês preto, Jersey e mestiços do Japão, nos anos de 2008 a 2010 através da análise RFLP do fragmento de 440 pb do gene *env*, utilizando cinco enzimas de restrição *Bam*HI, *Hae*III, *Tru*9I, *Taq*I e *Mwo*I. Observaram através dessas análises a presença de sete genótipos do BLV circulantes no Japão.

De acordo com estudo realizado por Balic et al. (2012), onde realizou-se o sequenciamento e análise filogenética do BLV de amostras de sangue de bovinos holandeses de seis grandes fazendas leiteiras da Croácia, comparando-se com 32 sequências do gene *env* que representam todos os genótipos identificados previamente, observou-se através do sequenciamento substituições em seis nucleotídeos e dois aminoácidos e através da análise filogenética identificou-se um novo genótipo.

Matsumura et al. (2010), realizaram um estudo com a análise filogenética da sequência de 356 pb do gene *env*, de 64 tumores de animais da raça Holandesa, Japonês preto, Jersey e mestiços diagnosticados com linfossarcoma, provenientes de frigoríficos entre os anos de 2008 a 2010. Este estudo demonstrou que a maior parte dos isolados Japoneses pertenceu ao genótipo 1 e que existem duas maiores populações do vírus circulantes em todo o país, supondo assim que pode ocorrer a entrada de genótipos virais geneticamente distintos através da importação de animais.

A hipótese do trabalho realizado por Rodriguez et al. (2009), foi de que a maior parte dos diferentes grupos do BLV identificados até o momento, correspondem a um limitado grupo de genótipos que são distribuídos de forma irregular por todo mundo. Para averiguar a veracidade desta hipótese, os presentes autores realizaram um estudo comparando a sequência do gene *env* de 28 isolados de BLV de campo com 46 sequências do gene *env* que representam os grupos genéticos identificados até o momento. Através da análise filogenética puderam identificar seis genótipos, sendo que os genótipos de um a cinco, apresentaram homologia com as sequências identificadas anteriormente. Uma sequência do gene *env* não se enquadrou em nenhum grupo identificado previamente e em nenhum dos 6 genótipos identificados neste trabalho, propondo assim a existência de um sétimo genótipo.

Através da análise RFLP da sequência parcial de nucleotídeos do gene *env* (444 bp), Camargos et al. (2007), observaram em oito bovinos do PR, MG, MS e GO, a presença do genótipo 1 do BLV em quatro animais e o genótipo 6 em três

animais. Em três amostras de uma mesma fazenda, onde o rebanho era formado por animais comprados de diferentes lugares, foram observados dois genótipos, fato este que pode ser explicado pelo uso do mesmo pasto por diferentes rebanhos, em rebanhos vizinhos através de vetores como insetos e uso de mesma agulha em vacinações em massa. Através da análise filogenética observaram a presença de quatro grupos, sendo o grupo 1 com isolados da Argentina e Brasil, grupo 2 com isolados do Brasil, Austrália, Japão e USA, grupo 3 com isolados do Chile e Europa e grupo 4 com isolados do Brasil, Chile e Itália. No entanto, diferentes distribuições dos isolados nos quatro grupos foram citadas por outros autores. Já a análise filogenética da sequência genética do BLV, mostrou a presença de três grupos, grupo 1 com isolados da Argentina e Brasil, grupo 2 com isolados do Brasil, Japão e USA e grupo 3 com isolados europeus.

Os isolados Iranianos, através de sequenciamento e análise filogenética, foram classificados em dois grupos estreitamente relacionados. Outro grupo albergou isolados da França, Alemanha e BLV-FLK e outro, isolados da Austrália, Coreia, Japão, Brasil e Bélgica. Os isolados Iranianos são mais similares com isolados da Europa e Austrália, sendo um pouco diferentes de isolados do Extremo Oriente e América do Sul (HEMMATZADEH, 2007).

Para avaliar a variabilidade genética do BLV na América do Sul foi realizada análise filogenética do gene *env* da gp51 de isolados da Uruguai, comparando também com isolados da Argentina, Brasil e Chile. Os resultados destes estudos demonstraram presença de sete genótipos nesta região, sendo que todos os isolados do Uruguai foram pertencentes ao genótipo 1 e isolados da Argentina pertenceram aos genótipos 1, 2, 4 e 6, sendo o genótipo 2 isolado apenas nesse país. Isolados do Brasil se enquadraram nos genótipos 1, 5, 6 e 7 (MORATORIO et al., 2010).

Estudo realizado por Monti et al. (2005) através da análise RFLP e sequenciamento demonstrou a presença em rebanhos da Argentina Central de dois isolados, Argentino, presente em todos os rebanhos e Australiano, sendo encontrado apenas em dois rebanhos. A análise filogenética identificou três

grupos, grupo 1 composto por isolados da Argentina e Brasil, grupo 2 composto por um isolado do Brasil, vários isolados de países europeus, da Alemanha e do norte da França e o grupo 3 constituído de isolados do Japão e Alemanha.

De acordo com trabalho realizado por Zhao e Buehring (2007) foram identificados por análise filogenética quatro grupos de isolados do BLV, um grupo contendo isolados dos EUA (californiano), um segundo contendo isolados europeus, um terceiro com isolados da Costa Rica e o quarto grupo consenso.

Juliarena et al. (2013) classificaram bovinos Holandeses Argentinos infectados pelo BLV em dois grupos, de acordo com o perfil proviral, em baixa e alta quantidade de provirus. O sangue de animais do grupo com baixo título proviral foram inoculados em ovinos para amplificar cópias do provirus integrado. O gene *env* desses ovinos foi amplificado e sequenciado e observou-se a presença de três grupos. O primeiro grupo contendo a maioria das sequências analisadas, outro grupo contendo isolados Belga e o terceiro contendo sequências dos dois grupos analisados neste estudo e isolados japoneses e australianos.

Em estudo realizado por Abadneh et al. (2012) foi detectada a presença dos genótipos 1 (BLV-Jordan-30) e 6 (BLV-Jordan-10) do BLV em fazendas leiteiras da Jordânia através de PCR e análise RFLP de um fragmento de 444 pb do gene *env* pela digestão com as enzimas *HaeIII*, *Bcl I* e *Pvu II*. Na análise filogenética o BLV-Jordan-10 representou um novo genótipo.

Através de análise filogenética, Licursi et al. (2003), observaram ainda a divisão do BLV em dois grupos, o primeiro incluindo a maior parte das amostras Japonesas, seis amostras Argentinas e ainda amostras da Austrália e USA e o segundo grupo composto pela maior parte das amostras Argentinas, sendo levemente diferentes de amostras Europeias. A importância de se identificar os diferentes genótipos do BLV consiste na implementação de políticas de manejo adequadas e desenvolvimento de estratégias antivirais e vacinas apropriadas e específicas para cada genótipo viral (MORATORIO et al., 2010).

3 CAPÍTULO ÚNICO – ARTIGO

DETERMINAÇÃO DA HETEROGENEIDADE DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA NO ESTADO DE SANTA CATARINA.

**Determination of the heterogeneity among bovine leukemia
virus from Santa Catarina State.**

RESUMO

O vírus da Leucose Bovina (BLV) membro da família *Retroviridae*, gênero *Deltaretrovirus*, é um agente importante em bovinos, sendo responsável por perdas econômicas principalmente em rebanhos leiteiros, podendo causar prejuízos em torno de 10% na produção. A infecção pelo BLV, pode manifestar-se de duas formas, uma benigna, que atinge aproximadamente 30% dos animais infectados, cursando com linfocitose persistente, e a forma maligna, muitas vezes fatal, que atinge aproximadamente 5% dos animais, com surgimento de tumores linfóides (linfossarcomas). Atualmente, vários estudos têm sido realizados a cerca dos genótipos do BLV, encontrando-se pelo menos sete genótipos, em amostras de diferentes locais do mundo. O presente estudo teve como objetivo, a genotipagem do BLV, em rebanhos leiteiros do estado de Santa Catarina. Foram coletadas 454 amostras de sangue de bovinos leiteiros de 31 propriedades e quatro búfalos sendo realizada inicialmente a sorologia pelo teste de imunodifusão em gel de ágar (IDGA). Coletaram-se também amostras de tumores com diferentes

localizações: linfonodo, coração, intestino e musculatura próximo ao coxal, de três bovinos. Após a sorologia 191 amostras foram constatadas como soropositivas sendo submetidas então à extração de DNA e em 62 amostras realizou-se a reação da polimerase em cadeia (PCR), visando a amplificação de um fragmento 440 pb do gene *env*, assim como nas amostras de tumores. Dezenove amostras extraídas de sangue e dos tumores foram submetidas à análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), através da digestão do fragmento da PCR por cinco endonucleases de restrição, *Bam*HI, *Hae*III, *Tru*9I, *Taq*I e *Mwo*I. Os resultados obtidos na sorologia demonstraram 42% dos soros dos bovinos analisados positivos (191/454), 68% de propriedades positivas (21/31), nenhum soro bubalino positivo e as amostras de tumores foram positivas em sua totalidade na PCR. Nas análises por RFLP identificamos cinco perfis diferentes correspondendo a cinco genótipos circulantes no Estado. Dentre os genótipos encontrados neste trabalho, o mais prevalente foi o genótipo X (47,4%). Este estudo permitiu conhecer alguns dos genótipos virais presentes em bovinos no Estado de Santa Catarina sendo estes resultados úteis para futuros estudos epidemiológicos, assim como identificar a existência de novas variantes circulantes e sua prevalência.

Palavras chave: BLV. Deltaretrovírus. Bovinos leiteiros. *env*. RFLP.

ABSTRACT

Bovine leukemia virus (BLV) is a member of the family *Retroviridae*, genus *Deltaretrovirus* and it is an important agent, being primarily responsible for economic losses in dairy herds, causing losses of around 10% in production. The infection of BLV, can manifest itself in two ways, benign one, which reaches approximately 30% of the animals infected with concomitant

persistent lymphocytosis and malignant condition, often fatal, affecting approximately 5% of animals with tumor appearance lymphoid (lymphosarcomas). Currently, several studies have been made about of BLV genotypes, finding at least seven genotypes, in samples of different parts of the world. The aim of this study was the molecular characterization of samples of BLV from seropositive dairy cattle in Santa Catarina State. Were collected 454 blood samples of dairy cattle of the 31 properties and four buffaloes, being initially performed serology using agar gel immunodiffusion test (IDGA). Also collected tumor samples with different locations: lymph node, heart, intestine and muscle near the coxal from three cattle. After serology 191 samples were found to be seropositive then submitted to DNA extraction and in 62 samples were performed the polymerase chain reaction (PCR) for amplification of a 440 bp fragment of the *env* gene, as well as the tumor samples. Nineteen samples extracted from blood and tumors samples were submitted to restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) by digestion of the PCR fragment for five restriction endonucleases, *Bam*HI, *Hae*III, *Tru*9I, *Taq*I and *Mwo*I. The results obtained in serology demonstrated 42% seropositive animals (191/454) and 68% positives properties (21/31), buffaloes no positive and tumor samples were positive in its entirety in PCR. In RFLP analysis identified five different profiles corresponding to five genotypes circulating in the State. Among the genotypes found in this study, the highest prevalence was observed genotype X (47.4%). This study allows us to know some the viral genotypes present in cattle in the Santa Catarina state and these results useful for future epidemiological studies, as well as identify the existence of new variants and their current prevalence.

Keywords: BLV. Deltaretrovirus. Dairy cattle. *env*. RFLP.

3.1 INTRODUÇÃO

O vírus da leucose bovina (BLV) é um membro do gênero *Deltaretrovirus*, família *Retroviridae*, apresentando similaridades com o vírus T linfotrópico humano tipo 1 e 2 (TOSTES, 2005).

O BLV é o agente causador da Leucose Enzoótica Bovina, doença de distribuição mundial e sua prevalência varia amplamente entre os rebanhos, sendo maior em gado leiteiro. Dos animais infectados 30% podem desenvolver linfocitose persistente (LP) que é o aumento dos linfócitos circulantes, neste caso os linfócitos B, e apenas 2 a 5% poderão desenvolver linfossarcomas (LEUZZI JR. et al., 2001).

Os *Retrovirus* têm o genoma constituído por duas moléculas de RNA de fita simples e polaridade positiva, sendo mais propensos a mutações do que os vírus com genoma composto por DNA (CANN, 2005). Isto ocorre em sua maior parte pela falta de um mecanismo que corrija os erros na incorporação de nucleotídeos que ocorrem devido a baixa fidelidade da polimerase viral (WILLEMS et al., 1993). A maior parte das mutações são pontuais e ocorrem nas sequências de nucleotídeos, podendo levar a substituições de aminoácidos da glicoproteína de superfície (RODRIGUEZ et al., 2009).

A análise RFLP baseia-se na genotipagem através da sequência parcial do genoma e vem sendo bastante utilizada, por fornecer uma idéia da composição geral do genoma viral, quando a informação detalhada não encontra-se disponível. Consiste na análise dos fragmentos de restrição gerados pela clivagem do produto da PCR com endonucleases de restrição (ZHAO; BUEHRING, 2007). O gene *env* que possui 1.547 pb é o mais utilizado nesta análise por ser o mais variável e por fornecer uma idéia geral do genoma do BLV que é de 8.714 pb.

Diversos autores relatam a existência de seis a sete genótipos do BLV através da análise RFLP, sendo que alguns ainda citam a possível existência de um novo genótipo (RODRIGUEZ et al., 2009; MORATORIO et al., 2010; ABADNEH et al., 2012). Através da análise filogenética vários autores citam ainda a classificação do BLV em dois a quatro grupos (CAMARGOS et al., 2007; HEMMATZADEH, 2007; MONTI et al.,

2005; ZHAO; BUEHRING, 2007; JULIARENA et al., 2013; LICURSI et al., 2003).

Tendo em vista os diversos estudos que tem sido realizados a cerca da variabilidade genética do BLV e a falta destes estudos em Santa Catarina, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a existência de diferentes genótipos do BLV em rebanhos leiteiros do Estado de Santa Catarina, através da genotipagem pela análise RFLP. Sendo possível então, através da identificação destes genótipos, determinar a prevalência dos genótipos virais nas quatro mesorregiões analisadas e montar um perfil do BLV no Estado de Santa Catarina, podendo assim rastrear as infecções causadas pelo BLV e fornecer subsídio para o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle e prevenção para cada genótipo viral, como o desenvolvimento de vacinas específicas.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Coleta de amostras

Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas visitas em propriedades de bovinos leiteiros selecionadas ao acaso, entre janeiro de 2012 à abril de 2013, distribuídas em quatro principais mesorregiões do Estado de Santa Catarina. As amostras foram coletadas de acordo com a disponibilidade, por serem propriedades heterogêneas, buscando-se quando possível coletar pelo menos amostras de 15 bovinos por propriedade. As mesorregiões de coleta foram: sul, serra, oeste e norte. Foram obtidas amostras de 31 propriedades, sendo oito propriedades de bovinos localizadas na região norte, quatro propriedades na região oeste, 12 propriedades na região sul e sete propriedades na região da serra catarinense. Os animais amostrados foram, em sua maioria, bovinos das raças Holandesa, Jersey e mestiços utilizados para produção de leite, e búfalos de uma propriedade localizada na serra catarinense. Foram analisadas também amostras de tumores, provenientes de três bovinos necropsiados com suspeita de LEB, na região da serra catarinense.

Foram obtidas amostras de sangue da veia caudal, de bovinos leiteiros e búfalos, utilizando-se tubos com vácuo siliconizado com ativador de coágulo (Labor Import, São Paulo, Brasil) e anticoagulante EDTA K3 (Vacuplast Collect Line, Nanchang, China) e na necropsia coletaram-se tumores de linfonodo, intestino, musculatura próximo ao coxal e coração.

3.2.2 Preparação das amostras

Os tubos contendo sangue com e sem anticoagulante foram submetidos a centrifugação por 10 minutos a 403 x *g* em centrífuga de mesa (Janetzki ® T150, Alemanha).

Para a realização do teste sorológico, após a centrifugação, os soros foram transferidos para microtubos de 2 mL (Axygen Scientific Inc, Union City, Estados Unidos), e armazenados a – 20° C até a realização do teste de IDGA.

As amostras de sangue com anticoagulante, após a centrifugação, foram utilizadas para obtenção da camada de leucócitos, que foi aspirada com a ajuda de uma micropipeta e acondicionada em microtubos de 1,5 a 2 mL (Axygen Scientific Inc, Union City, Estados Unidos).

Para a eliminação dos eritrócitos o aspirado de células brancas foi submetido a aproximadamente 5 lavagens com uma solução de Tris EDTA pH 8 (Anexo A), sendo o material centrifugado a 2000 x *g* por cinco minutos em centrífuga Minispin® (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) entre cada lavagem, totalizando em média cinco lavagens ou até que fosse retirado o máximo possível dos eritrócitos.

Após a etapa de lavagem, os leucócitos foram armazenados em ultrafreezer -80° C até a finalização do teste sorológico de IDGA, uma vez que a extração de DNA proviral foi realizada apenas com amostras dos animais considerados sorologicamente positivos.

Das amostras de tumores retirou-se uma pequena fração, seguindo-se de maceração e extração de DNA pelo protocolo do Tri Reagent® T9424 (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), conforme descrito no item 3.2.4.

3.2.3 Sorologia por imunodifusão em gel de ágar (IDGA)

Para execução do teste foi utilizado o kit para diagnóstico de BLV através de IDGA, produzido pelo TECPAR® (Instituto de Tecnologia do Paraná, Curitiba, Brasil). A técnica foi realizada seguindo-se a recomendação do fabricante. Os soros a serem testados e o soro controle positivo foram dispostos no ágar nos poços ao redor do poço central em um volume aproximado de 25 μ L por poço. A seguir, foi adicionado 25 μ L do antígeno no poço central. Foram testadas quatro amostras em cada roseta. Após a adição dos reagentes, as placas com ágar foram incubadas em câmara úmida em temperatura ambiente por até 72 h sendo então feita a leitura e interpretação do teste com o auxílio de uma lâmpada de luz forte sob fundo preto.

Foram consideradas positivas as amostras em que houve formação de uma linha de precipitação entre o poço central contendo o antígeno e o poço com uma amostra de soro testada e também a linha de identidade com o soro controle positivo.

As amostras de sangue dos animais soropositivos e as amostras de tumores foram submetidas à extração de DNA e PCR visando amplificação da sequência de 440 pb do gene *env* do BLV.

3.2.4 Extração de DNA

Para obtenção do DNA proviral presente nos leucócitos dos animais soropositivos e nos tumores, foi adicionado 1 mL de Tri Reagent® T9424 (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) as amostras, mantendo-as em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente. O protocolo utilizado foi o recomendado pelo fabricante, seguindo-se, após o repouso inicial, a adição de 200 μ L de clorofórmio C2432 (Sigma Aldrich, St. Gallen, Alemanha). Os tubos foram agitados vigorosamente por 15 s em vórtex e posteriormente permaneceram em repouso por 2 a 15 min em temperatura ambiente e a solução resultante foi centrifugada a 12.000 x g por 15 min.

A fase aquosa incolor remanescente, sobreposta a interface, foi removida cuidadosamente e descartada.

Para precipitação do DNA adicionou-se então 300µL de etanol 100% E7023 (Sigma Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e realizou-se a mistura por inversão e as amostras foram mantidas em repouso por 2 a 3 min em temperatura ambiente. Após, foram centrifugadas a 2.000 x *g* por 5 min e o sobrenadante remanescente foi descartado, sobrando apenas o *pellet* de DNA.

O *pellet* de DNA foi então lavado três vezes com 1 mL de solução de citrato de sódio 0,1M com 10% de etanol (Anexo B). Após cada lavagem, a mistura foi centrifugada a 2.000 x *g* por 5 min.

O pellet de DNA remanescente foi ressuspenso em 1 mL de etanol 75% e mantido em repouso por 10 a 20 min em temperatura ambiente e em seguida a solução de etanol foi removida e o *pellet* de DNA seco por 5 a 10 min em temperatura ambiente e dissolvido em 100 µL da solução de 8mM de NaOH. O *pellet* de DNA permaneceu nesta solução resfriado a 4° C *overnight*, para que esta solução alcalina suave assegurasse a dissolução do *pellet* de DNA, permanecendo posteriormente armazenado em NaOH em freezer – 20° C.

3.2.5 Amplificação do gene *env* do BLV por PCR

Terminada a extração do DNA proviral, um fragmento de 440 pb do gene *env* foi amplificado através da técnica de PCR. Para isto, foi preparado o mix de reação composto por 20 µL do PCR Master Mix® (Quatro G Ltda., Porto Alegre, Brasil) e 1 µL de cada *primer* OBLV1A (5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATACA-3') e OBLV6A (5'-CCAACATATAGCACAGTCTGGGAAGGC-3'), descritos pela OIE e 3 µL da amostra de DNA, sendo o volume final de reação de 25 µL.

Em seguida os microtubos foram transferidos para o termociclador Biocycler® MJ96+ (Biosystems, São José dos Pinhais, Brasil).

As condições de reação foram de 5 min a temperatura de 94° C, seguido de cinco ciclos a 94° C por 45 s, 60° C por 60 s e

72° C por 90 s, sendo em seguida realizados mais 35 ciclos de 94° C por 45 s, 59° C por 60 s e 72° C por 90 s. Por fim, um ciclo a 72° C por 7 min.

O fragmento amplificado foi de 440 pb do gene *env* referente a posição 5029 – 5468 do genoma viral.

Os produtos da amplificação foram então analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado em solução TAE 1X (Anexo C), corado com uma solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

Por fim, realizou-se a leitura do gel em transluminador (DNR Bio- Imaging Systems Mini Bis Pro, Jesusalém, Israel), com o software de captura de imagem Gel Capture.

3.2.6 Análise dos produtos da PCR pela análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP)

Este processo consistiu na digestão de um fragmento do genoma viral de 440 pb, com 10 U das endonucleases de restrição *Bam*HI (Promega, Madison, Estados Unidos); *Hae*III (Promega, Madison, Estados Unidos); *Tru*9I (Promega, Madison, Estados Unidos); *Taq*I (Promega, Madison, Estados Unidos) e *Mwo*I (New England Biolabs® Inc., Ipswich, Inglaterra). Sendo as reações de digestão para cada enzima de restrição descritas na tabela 1.

Todas as reações foram realizadas em termocilador Biocycler® MJ96+ (Biosystems, São José dos Pinhais, Brasil).

Após a digestão das amostras com as cinco enzimas, realizou-se a eletroforese em gel de agarose a 3,5% e posterior leitura em transluminador (DNR Bio- Imaging Systems Mini Bis Pro, Jesusalém, Israel), com o software de captura de imagem Gel Capture..

O método de comparação para classificação dos genótipos do BLV foi baseado em uma tabela descrita por Inoue et al. (2011) relacionando os possíveis tamanhos de fragmentos formados após a digestão com cada enzima de restrição e as diferentes combinações destes que dão origem aos sete diferentes genótipos virais.

Tabela 1 - Reação de digestão para as enzimas de restrição utilizadas

Enzimas de restrição	<i>Bam</i>HI, <i>Hae</i>III	<i>Tru</i>9I, <i>Taq</i>I	<i>Mwo</i>I
Água ultra pura DNAse Free	12,3 µL	12,3 µL	12 µL
Tampão *	2 µL	2 µL	2 µL
Tampão BSA acetilado 10 µg/µL	0,2 µL	0,2 µL	-
Enzima de restrição 10 u/µL	0,5 µL	0,5 µL	1 µL
DNA amplificado	5 µL	5 µL	5 µL
Tempo/Temperatura de reação	1 h/37° C	1 h/65° C	1 h/60° C
Total	20 µL	20 µL	20 µL

*específico para cada enzima utilizada

Fonte: Próprio autor

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Resultados gerais

Estão representados na tabela 2, de maneira geral a quantidade de amostras coletadas por região, análises realizadas e resultados obtidos. Na região oeste foram coletadas 72 amostras em quatro propriedades, sendo 13 positivas na sorologia. Realizou-se a PCR de 11 amostras sendo nove positivas e a genotipagem de duas amostras, demonstrou a ocorrência do genótipo VIII. Na região da serra, coletaram-se 167 amostras em sete propriedades, sendo 114 positivas na

sorologia. A PCR de 36 amostras demonstrou 30 positivas e na genotipagem de oito amostras encontrou-se o genótipo II em duas amostras, genótipo I em uma amostra, IX em uma amostra e X em quatro amostras. Na região sul, coletaram-se 176 amostras em 12 propriedades, sendo 51 positivas na sorologia e 21 na PCR, de 28 analisadas. Na análise RFLP foram analisadas 8 amostras, encontrando-se o genótipo I em uma amostra, VIII em uma amostra, IX em duas amostras e X em quatro amostras. Por fim, na região norte foram coletadas 39 amostras em oito regiões, sendo 13 positivas na sorologia, realizando-se a PCR de duas amostras, sendo as duas positivas e na análise RFLP encontrou-se uma amostra do genótipo X.

Tabela 2 – Dados gerais sobre a quantidade de amostras, regiões de coleta, análises realizadas e resultados obtidos

Região	Propriedade	Sorologia		PCR				
		+	+	I	II	VIII	IX	X
Oeste	4	13(72)	9(11)			2		
Serra	7	114(167)	30(36)		2	1	1	4
Sul	12	51(176)	21(28)	1		1	2	4
Norte	8	13(39)	2(2)					1
Total	31	191(454)	62(77)	1(19)	2(19)	4(19)	3(19)	9(19)

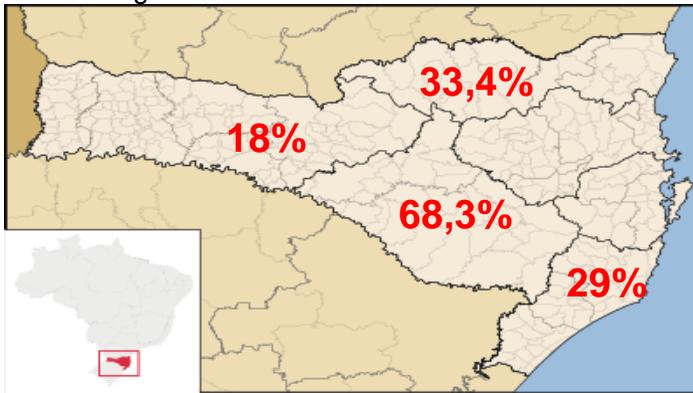
Fonte: Próprio autor

3.3.2 Sorologia para Leucose Enzoótica Bovina

Através da realização da sorologia das 454 amostras de sangue de bovinos leiteiros coletadas, de 31 propriedades distribuídas em quatro regiões do Estado de Santa Catarina (Figura 1), observou-se um total de 191 animais soropositivos

(42,1%) e 21 propriedades com ao menos um animal soropositivo (67,7%).

Figura 1 - Porcentagem de animais soropositivos nas diferentes mesorregiões de Santa Catarina



Fonte: Wikipédia

Na região Oeste, 72 animais foram amostrados em quatro propriedades, totalizando 13 animais soropositivos, sendo o menor número de animais positivos observado no Estado. Na região Serrana, foram avaliados 167 animais de sete propriedades, destes, 114 animais foram soropositivos, observando-se o maior número de positividade do Estado. Na região Sul, foram amostrados 176 animais de 12 propriedades, totalizando 51 animais soropositivos. Por fim, amostrou-se 39 animais de oito propriedades da região Norte, sendo 13 soropositivos.

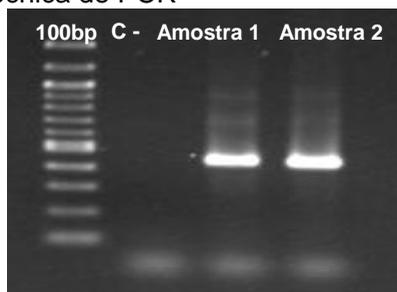
Foram analisadas ainda por sorologia quatro amostras de sangue de búfalos de uma propriedade da região serrana, não havendo no entanto, amostras soropositivas.

3.3.3 Detecção do provirus do BLV pela técnica da PCR

Das 191 amostras positivas na sorologia, realizou-se a reação de PCR de 77 amostras, sendo que em 62 obteve-se a amplificação do fragmento de interesse de 440 pb do gene *env*, assim como nas amostras de tumores testadas, como exemplificado na figura 2.

Todas as amostras de búfalos foram negativas na técnica de PCR, concordando com os resultados obtidos na IDGA.

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo demonstrando a amplificação do fragmento de 440 pb do gene *env* das amostras 1 e 2 pela técnica de PCR



Fonte: Arquivo pessoal

3.3.4 Classificação do BLV pela análise RFLP dos produtos da PCR do gene *env*

O amplicon de uma amostra de cada propriedade que apresentou animais soropositivos para o BLV foi submetido a digestão por cinco endonucleases de restrição, *Bam*HI, *Hae*III, *Tru*9I, *Taq*I e *Mwo*I, assim como as amostras dos tumores, totalizando 19 amostras.

A digestão com a enzima *Bam*HI, apresentou dois diferentes padrões de clivagem, um formando bandas de 240 e 200 pb e outro onde formou-se apenas uma banda de 440 pb.

A digestão com a enzima *HaeIII* clivou todos os amplicons em cinco bandas de 200, 90, 65, 35 e 25 pb.

Para a digestão com a *Tru9I*, obteve-se dois diferentes padrões de clivagem, um formando duas bandas de 400 e 40 pb, observado na maior parte das amostras e uma amostra com clivagem em três bandas, 270, 130 e 40 pb.

A *TaqI* apresentou também dois diferentes padrões de clivagem. Um formando duas bandas com tamanho de 280 e 160 pb, outro com três bandas de 230, 160 e 50 pb.

Por fim, as amostras foram digeridas pela enzima *MwoI* e apresentaram três padrões de clivagem diferentes, um com três bandas de 250, 160 e 30 pb, outro com duas bandas de 280 e 160 pb e o terceiro com três bandas de 250, 100 e 90 pb. Estes diferentes padrões de clivagem estão descritos na tabela 2 e o exemplificados na figura 3.

Tabela 3 - Produtos gerados pela clivagem do fragmento de 440 pb do gene *env* do BLV com as enzimas de restrição

Tipo RFLP	Enzimas de restrição				
	<i>BamHI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>Tru9I</i>	<i>TaqI</i>	<i>MwoI</i>
I	240, 200	200, 90, 65, 35, 25	270, 130, 40	280, 160	250, 160, 30
II	240, 200	200, 90, 65, 35, 25	400, 40	280, 160	250, 160, 30
VIII	240, 200	200, 90, 65, 35, 25	400, 40	230, 160, 50	280, 160
IX	440	200, 90, 65, 35, 25	400, 40	280, 160	250, 160, 30
X	240, 200	200, 90, 65, 35, 25	400, 40	280, 160	250, 100, 90

Fonte: Próprio autor

Os genótipos I e II identificados neste estudo, condizem com achados anteriores descritos por Inoue et al. (2011), no entanto identificamos três genótipos ainda não descritos, sendo estes classificados como VIII, IX e X, estando o genótipo IX identificado na figura 3. Estes resultados indicam a existência de novas variantes do BLV circulando no Estado de Santa Catarina.

Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose a 3,5% corado com brometo de etídeo demonstrando a digestão com as enzimas de restrição do fragmento de 440 pb do gene *env* do BLV. O genótipo identificado nesta amostra foi o IX.



Fonte: Arquivo pessoal

3.3.5 Prevalência dos genótipos virais pela análise RFLP

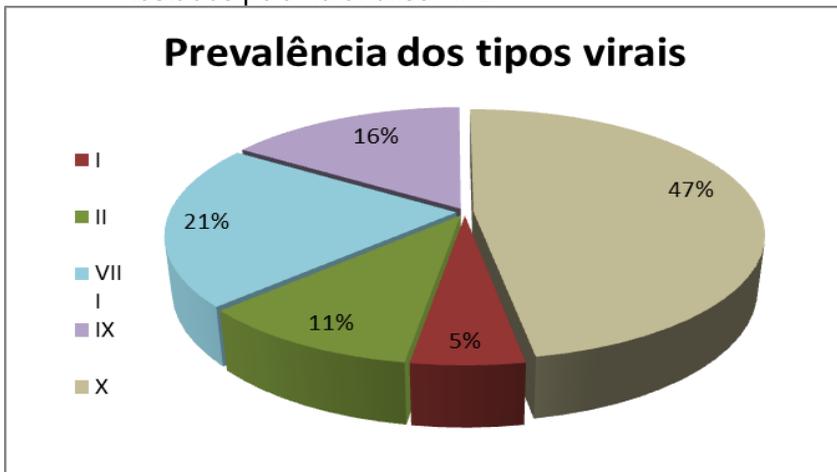
Na figura 4, podemos observar a prevalência dos genótipos do BLV pela análise RFLP nas amostras analisadas.

Segundo a análise realizada, o genótipo I apresentou a menor prevalência (5%), onde apenas um animal apresentou esse genótipo. Para o genótipo II foram identificados dois animais (11%), para o genótipo VIII, quatro animais (21%), para o

genótipo IX, três animais foram identificados (16%) e por fim, o genótipo X, apresentou a maior prevalência (47%), com nove animais, dentre os 19 testados.

Desta forma, vale ressaltar que neste estudo pudemos observar que cinco são os genótipos circulantes no Estado de Santa Catarina, existindo um genótipo mais prevalente, o X.

Figura 4 - Prevalência dos genótipos virais entre os animais testados pela na análise RFLP



Fonte: Próprio autor

3.3.6 Relação dos genótipos com as mesorregiões analisadas

Dentre as mesorregiões analisadas, podemos destacar na tabela 4, a predominância de alguns genótipos de acordo com as regiões.

Tabela 4 - Predominância dos genótipos virais de acordo com as mesorregiões do estado de Santa Catarina

Mesorregiões				
	Norte	Sul	Oeste	Serra
Tipo RFLP	X	I	VIII	II
		VIII		IX
		IX		X
		X		

Fonte: Próprio autor

3.3.7 Relação entre os genótipos virais e os tumores analisados

A tabela 5 demonstra a análise de três tumores do animal A, dois tumores do animal B e um tumor do animal C, sendo encontrado o mesmo genótipo viral em tumores do mesmo animal independente da localização destes.

Tabela 5 - Genótipos do BLV encontrados em tumores localizado em diferentes regiões

Animal	Tumores	Tipo RFLP
A	Linfonodo	II
A	Próximo ao coxal	II
A	Intestino	II
B	Linfonodo	X
B	Coração	X
C	Linfonodo	IX

Fonte: Próprio autor

3.4 DISCUSSÃO

No presente estudo 191/454 (42,1%) amostras de sangue foram positivas para o BLV, resultados diferentes dos encontrados por Moraes et al. (1996) com apenas 12% dos animais positivos no RS, Carvalho et al. (1996) com 7% em bovinos de Londrina PR e Luders (2001) com 7,6% de bovinos positivos na região norte de SC. Outros autores no entanto encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo, Barros Filho et al. (2009) encontraram prevalência de 56,3% em Curitiba PR, Cordeiro et al. (1994) 35% em Itajaí SC, D'Angelino et al. (1998) 54% em SP e Rajão (2008) em MG encontrou prevalência mais elevada (79,7%), assim como Monti et al. (2005), com prevalência de 70% na PCR e 90% na IDGA.

Quanto a prevalência de propriedades positivas encontramos 21/31 (67,7%), resultado bastante elevado quando comparado com os resultados encontrados por outros autores como, Moraes et al. (1996) 29,1%, Carvalho et al. (1996) 35,7% e Luders (2001) 10,8%.

As amostras de búfalos analisadas, não foram positivas para o BLV nem na sorologia (IDGA), nem através da técnica de PCR, resultado semelhante aos encontrados por Chaves et al. (2012) que observaram a prevalência de 4,3%, em búfalos do Maranhão, Meas et al. (2000) encontraram 0% de prevalência em búfalos do Camboja e em estudo feito em 1999 no Paquistão, detectaram a prevalência de 0,8%. Diversos estudos demonstram que a prevalência em bubalinos é de baixa intensidade, no entanto como avaliamos um número limitado de amostras não foi possível afirmar se estes resultados são verdadeiros.

Nas amostras positivas houve amplificação através da técnica de PCR de um fragmento de 440 pb do gene *env*, assim como no estudo realizado por Inoue et al. (2011) e Matsumura et al. (2010) que também amplificaram este fragmento, correspondente a posição 5029 – 5468 do genoma viral em amostras de tumores.

Neste trabalho os produtos da PCR do gene *env* foram submetidos à análise por restrição enzimática com 5

endonucleases de restrição, semelhante ao trabalho realizado por Inoue et al. (2011) que também utilizaram as mesmas enzimas, com exceção da *Tru9I*, onde a enzima utilizada por estes autores foi a *MseI*, porém ambas possuem o mesmo sítio de clivagem.

No presente estudo observaram-se dois diferentes padrões de clivagem para o fragmento de 440 pb, pela enzima *BamHI*, um formando dois tamanhos de bandas, de 240 e 200 pb encontrado nos genótipos I, II, VIII, X e outro onde formou-se apenas uma banda de 440 pb, ou seja, o fragmento não foi clivado, sendo encontrado no genótipo IX. Estes achados foram semelhantes aos encontrados por Inoue et al. (2011) que observaram em amostras de tumores analisadas apenas um padrão de clivagem, com bandas de 240 e 200 pb, não sendo portanto este padrão definitivo para a genotipagem.

A clivagem dos amplicons com a enzima *HaeIII* originou cinco fragmentos de 200, 90, 65, 35 e 25 pb, não sendo este padrão, definitivo para a genotipagem, por ter sido encontrado em todos os genótipos, condizendo com padrão também encontrado por Inoue et al. (2011) que identificaram além deste mais um padrão de clivagem diferente, formando quatro bandas com tamanhos de 290, 65, 35, e 25 pb para o fragmento de 440 pb na posição 5029 – 5468.

A enzima *Tru9I*, obteve dois diferentes padrões de clivagem, um formando duas bandas de 400 e 40 pb, observado na maior parte das amostras e uma amostra com clivagem em três bandas, 270, 130 e 40 pb, estando em concordância com os achados de Inoue et al. (2011). No entanto, estes autores encontraram ainda um terceiro padrão, com bandas de 360 e 40 pb.

A *TaqI* apresentou também dois diferentes padrões de clivagem, um formando duas bandas com tamanho de 280 e 160 pb e outro com três bandas de 230, 160 e 50 pb. Inoue et al. (2011) encontraram também estes dois padrões de clivagem e ainda um terceiro, com bandas de 240, 160 e 40 pb.

Por fim, as amostras foram digeridas pela enzima *MwoI* e apresentaram três padrões de clivagem diferentes, um com três bandas de 250, 160 e 30 pb, outro com duas bandas de 280 e

160 pb, concordando com os achados de Inoue et al. (2011), porém encontramos também um terceiro padrão com três bandas de 250,100 e 90 pb, não descrito pelos autores anteriormente citados.

Neste trabalho, pudemos observar cinco genótipos circulantes nas amostras analisadas de bovinos no estado de Santa Catarina, dentre eles os genótipos I e II descritos por Inoue et al. (2011) no Japão e que identificaram no total sete genótipos do BLV através da análise RFLP do fragmento de 440 pb do gene *env*, de amostras de tumores de bovinos, utilizando enzimas de restrição com o mesmo sítio de restrição usado neste trabalho. Sete genótipos do BLV também foram identificados por Moratório et al. (2010) através de sequenciamento e análise filogenética de amostras de sangue de bovinos do Uruguai e por Balic et al. (2012) e Matsumura et al. (2010), realizando um estudo com sequenciamento e análise filogenética do fragmento de 356 pb do gene *env* de amostras de sangue de bovinos da Croácia e de tumores no Japão, observaram ainda um novo genótipo.

Rodriguez et al. (2009) através de sequenciamento e análise filogenética do gene *env* de amostras de bovinos da Argentina, identificaram seis genótipos assim como Licursi et al. (2002) e propuseram a existência de um sétimo genótipo, assemelhando-se também ao achados anteriores. Camargos et al. (2007) observaram em bovinos do PR, MG, MS e GO e Abadneh et al. (2012) em bovinos de leite da Jordânia pela análise RFLP de um fragmento de 444 pb do gene *env* com enzimas de restrição, a presença do genótipo I, também encontrado neste estudo e o genótipo 6, que não encontramos como circulante no estado de Santa Catarina. Monti et al. (2005) através de análise RFLP também encontraram dois genótipos, classificados como Australiano e Argentino.

Dentre os cinco genótipos encontrados, sendo eles I, II, VIII, IX, 1X, o genótipo I já foi descrito por Moratório et al. (2010), que detectou em amostras brasileiras além deste, os genótipos V, VI, e VII, resultados semelhantes ao obtidos por Camargos et al. (2007) em amostras do PR, MG, MS e GO, encontrando também os genótipos I e VI.

O genótipo X, assim denominado por não se enquadrar em nenhum dos genótipos descritos anteriormente foi o mais prevalente dentre as amostras analisadas, seguido dos genótipos VIII, IX, II e I, discordando de resultados encontrados por Matsumura et al. (2010), que identificaram através de análise filogenética de tumores de bovinos do Japão, a maior prevalência do genótipo I, ressaltando no entanto que estes autores descrevem a presença de duas maiores populações virais no país.

Quanto a predominância dos genótipos virais por região do Estado, vale destacar que dentre as amostras analisadas o genótipo X foi encontrado no norte, sul e serra, estando ausente na região oeste. O genótipo IX, foi encontrado nas regiões sul e serra. O genótipo VIII esteve presente nas regiões sul e oeste e o genótipo I ficou restrito a região sul, assim como o II à serra. Esses achados corroboram com a constatação de Rodriguez et al. (2009) que relataram que existe um limitado grupo de genótipos, estando estes distribuídos de forma irregular.

Ao menos uma amostra de cada genótipo irá futuramente ser submetida a sequenciamento.

Devido a escassez de estudos sobre a variabilidade do BLV no estado de Santa Catarina, é de grande importância identificar alguns dos genótipos circulantes no Estado, assim como a detecção de novos genótipos e a prevalência destes. Com este conhecimento pode-se rastrear as infecções causadas pelo diferentes genótipos do BLV, podendo identificar a introdução de novos genótipos provenientes de outros estados ou países através da importação de animais, de forma legal ou ilegal, visto que o estado de Santa Catarina é uma área livre de doenças como a febre aftosa, sendo portanto o rastreamento extremamente necessário. O conhecimento dos genótipos do BLV permite fornecer subsídio para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção específicos para cada genótipo viral, visto que atualmente não existe tratamento e eficaz vacina para esta doença. Sabe-se que o desenvolvimento de vacinas para retrovírus é extremamente difícil pela constante variação destes vírus, no entanto, identificar os genótipos do BLV já é um grande passo para se tentar desenvolver vacinas

específicas para cada genótipo viral ou vacinas que abrangam os genótipos mais prevalentes em determinada região ou rebanho.

3.5 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo nos permitiram concluir que:

Existem ao menos cinco genótipos do BLV circulantes dentre as amostras analisadas, podendo-se assim montar um perfil do BLV no Estado de Santa Catarina.

Dentre os genótipos identificados, três não foram descritos anteriormente, sendo um destes, classificado como genótipo X, o mais prevalente dentre as amostras analisadas.

Houve diferença na predominância dos genótipos de acordo com as mesorregiões analisadas.

Nas amostras de tumores observou-se a presença de genótipos também detectados nas amostras de sangue, encontrando o mesmo genótipo em tumores do mesmo animal independente da localização destes.

As amostras de búfalos não apresentaram anticorpos contra o BLV, não permitindo assim a genotipagem.

3.6 REFERÊNCIAS ARTIGO

ABADNEH, M.M. et al. Detection and molecular characterization of bovine leukemia viruses from Jordan. **Archives of Virology**, Austria, v.157, n.12, p.2343 - 2348, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22914962>>. Acesso em: 25 jan. 2013.

BALIC, D. et al. Identification of a new genotype of bovine leukemia virus. **Archives of virology**, Austria, v. 157, n. 7, p. 1281 – 1290, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22488472>>. Acesso em: 29 mar. 2013.

BARROS FILHO, I. R. et al. Prevalência da Leucose enzoótica em bovinos leiteiros criados na região metropolitana de Curitiba –

Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, p. 11 – 14, 2009, in press. Disponível em: <
<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7850/5657>>.
Acesso em: 22 mar. 2013.

CAMARGOS, M. F. et al. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine Leukemia Virus. **Virus genes**, [s.l.], v. 34 ,n. 3, p. 343 - 350, 2007. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16917740>>. Acesso em: 14 abr. 2013.

CANN, A.J. **Principles of Molecular Virology**. 4 ed. Estados Unidos: Elsevier Academic Press, 2005. 332p.

CARVALHO, L. et al.. Prevalência de anticorpos séricos de anti-vírus da leucose dos bovinos em animais da raça Holandesa Preta e Branca e zebuínos da raça Nelore, criados no pólo regional de Londrina, Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 53-57, 1996. Disponível em:
<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/5091/4658>. Acesso em: 29 mar. 2013.

CORDEIRO, J. L. et al. Identificação e controle da leucose enzoótica bovina (LEB) em um rebanho leiteiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 8, p. 1287-1292, 1994. Disponível em:<
<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/4176/1467>>. Acesso em: 15 abr. 2013.

CHAVES, N.P. et al. Intercorrência entre leucose enzoótica e brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em sistema de produção extensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 2, p. 131 – 134, 2012. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2012000200007&script=sci_arttext>. Acesso em: 14 mai. 2013.

D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil: Short Communication.

Tropical Animal Health and Production, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 13 – 15, 1998. Disponível em :<
<http://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A%3A1005053124518>>. Acesso em: 25 fev. 2013.

HEMMATZADEH, F. Sequencing and phylogenetic analysis of gp51 gene of bovine leukaemia virus in Iranian isolates. **Veterinary Research Communications**, Holanda, v. 31, n. 6, p. 783 – 789, 2007. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17294262>>. Acesso em: 04 out. 2012.

INOUE, E. et al. Genetic heterogeneity among bovine leukemia viruses in Japan and their relationship to leukemogenicity. **Archives of Virology**, Austria, v. 156, n. 7, p. 1137-114, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21387204>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

JULIARENA, M. A. et al. Partial molecular characterization of different proviral strains of bovine leukemia virus. **Archives of virology**, Austria, v. 158, n. 1, p. 63 – 70, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22965577>>. Acesso em: 09 fev. 2013.

LEUZZI JR, L. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 211-221, 2001. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2055>>. Acesso em: 22 fev. 2013.

LICURSI, M. et al. Genetic heterogeneity among bovine leukemia virus genotypes and its relation to humoral responses in hosts. **Virus Research**, Philadelphia, v. 86, n.1 – 2, p. 101 –110, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076834>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

LICURSI, M. et al. Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. **Veterinary**

Microbiology, [s.l.], v. 96, n. 1, p. 17 – 23, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113503002025>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

LUDERS, M. A. **Prevalência de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina em fêmeas com mais de dois anos no Rebanho de bovinos leiteiros no Município de Mafra-SC**. Lages, 2001, 30p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agroveterinária/Sanidade Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

MATSUMURA, K. et al. Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan. **Virus research**, Philidelphia, v. 155, n. 1, p. 343 – 348, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21095208>>. Acesso em: 13 jan. 2013.

MEAS, S. et al. Infection of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in Water Buffalo and Cattle Populations in Pakistan. **Journal of Veterinay Medical Science**, Tokyo, v. 62, n. 3, p. 329 – 331, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10770609>>. Acesso em: 25 mai. 2013.

MEAS, S. et al. Seroprevalence of Bovine Immunodeficiency Virus and Bovine Leukemia Virus in Draught Animals in Cambodia. **Journal of Veterinay Medical Science**, Tokyo, v. 62, n. 7, p. 779 – 781, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10945301>>. Acesso em: 25 mai. 2013.

MONTI, G.; SCHRIJVER, R.; BEIER, D. Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. **Archives of virology**, Austria, v. 150, n. 3, p.443 – 448, 2005. Disponível em :<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15592892>> . Acesso em: 15 mar. 2013.

MORAES, M. P. et al. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da Leucose Bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, 257-262, 1996. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v26n2/a15v26n2.pdf> >. Acesso em: 19 set. 2012.

MORATORIO, G. et al. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. **Archives of virology**, Austria, v. 155, n. 4, p. 481 – 489, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169372> >. Acesso em: 09 ago. 2012.

RAJÃO, D., de S. **Efeito da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina na produção de leite e reprodução de rebanhos leiteiros**. Belo Horizonte, 2008, 26p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal / Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RODRIGUEZ, S. M. et al. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. **Journal of General Virology**, [s.l.], v. 90, p. 2788 – 2797, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587134>. Acesso em: 12 set. 2012.

WILLEMS, L. et al. Bovine Leukemia Virus, an Animal Model for the Study of Intrastrain Variability. **Journal of virology**, Washington DC, v. 67 , n. 2 , p. 1086 – 1089, 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380455> >. Acesso em: 08 nov. 2012.

ZHAO, X.; BUEHRING, G.C. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. **Virology**, Amsterdam, v. 366, n. 1, p. 150 – 165, 2007.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498765>>. Acesso em: 03 mar. 2013.

4 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A existência de ao menos cinco genótipos do BLV circulantes nas amostras analisadas, nos permitiu montar um perfil do BLV no Estado de Santa Catarina.

Dentre os genótipos identificados, houve a descoberta de três genótipos não descritos anteriormente, sendo um destes, classificado como genótipo X, o mais prevalente entre as amostras analisadas do Estado.

Houve diferença na predominância dos genótipos dentre as mesorregiões analisadas, estando alguns disseminados e outros restritos a determinadas regiões.

Nas amostras de tumores observou-se a presença de genótipos também detectados nas amostras de sangue, encontrando o mesmo genótipo em tumores do mesmo animal independente da localização destes.

As amostras de búfalos não foram positivas ao teste de IDGA e PCR, não permitindo realizar a genotipagem pela análise RFLP.

Montar um perfil do BLV no Estado de Santa Catarina, serve como base para futuros estudos epidemiológicos, assim como para o rastreamento das infecções causadas pelos diferentes genótipos virais, podendo-se assim desenvolver medidas de controle efetivas e específicas para cada genótipo viral.

Devido a existência de poucos estudos sobre a infecção do BLV em búfalos, futuramente estes protocolos poderão ser utilizados para genotipagem de amostras encontradas em bubalinos.

Deverão ainda ser realizados mais estudos com tumores, tentando relacionar o genótipo viral com a localização dos tumores no animal.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADNEH, M. M. et al. Detection and molecular characterization of bovine leukemia viruses from Jordan. **Archives of Virology**, Austria, v.157, n.12, p.2343- 2348, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22914962>>. Acesso em: 25 jan. 2013.

BALIC, D. et al. Identification of a new genotype of bovine leukemia vírus. **Archives of virology**, Austria, v. 157, n. 7, p. 1281 – 1290, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22488472> >. Acesso em: 29 mar. 2013.

BARROS FILHO, I. R. et al. Prevalência da Leucose enzoótica em bovinos leiteiros criados na região metropolitana de Curitiba – Paraná. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, p. 11 – 14, 2009, in press. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/7850/5657>>. Acesso em: 22 mar. 2013.

BUEHRING, G. C.; KRAMME, P. M.; SCHULTZ, R. D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. **Laboratory Investigation**, [s.l.], v. 71, n. 3, p. 359-365, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7933986>>. Acesso em: 22 set. 2012.

BRUCK,C. et al. Topographical analysis by monoclonal antibodies of BLV-gp51 epitopes involved in viral functions. **Virology**, Amsterdam, v.122, n.2, p. 353 - 362, 1982. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6183820>. Acesso em: 08 fev. 2013.

BRUCK,C. et al. Biologically active epitopes of bovine leukemia virus glycoprotein gp51: their dependence on protein glycosylation and genetic variability. **Virology**, Amsterdam, v.136, n.1, p. 20 – 31, 1984. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6204449>. Acesso em: 08 fev. 2013.

CAMARGOS, M. F. et al. Development of a polymerase chain reaction and its comparison with agar gel immunodiffusion test in the detection of bovine leukemia virus infection. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 5, p. 341 – 348, jun. 2003. Disponível em : <http://www.scielo.br/pdf/bjvras/v40n5/a05v40n5.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2013.

CAMARGOS, M.F. et al. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of Bovine Leukemia Virus. **Virus genes**, [s.l.], v. 34 ,n. 3, p. 343 - 350, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16917740>>. Acesso em: 14 abr.2013.

CANN, A.J. **Principles of Molecular Virology**. 4 ed. Estados Unidos: Elsevier Academic Press, 2005. 332p.

CARVALHO, L. et al. Prevalência de anticorpos séricos de anti-vírus da leucose dos bovinos em animais da raça Holandesa Preta e Branca e zebuínos da raça Nelore, criados no pólo regional de Londrina, Estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 53-57, 1996. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/5091/4658>. Acesso em: 29 mar. 2013.

CORDEIRO, J. L. F. et al. Identificação e controle da leucose enzoótica bovina (LEB) em um rebanho leiteiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 8, p. 1287-1292, 1994. Disponível em:<<http://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/4176/1467>>. Acesso em: 15 abr. 2013.

CHAVES, N.P. et al. Intercorrência entre leucose enzoótica e brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em sistema de produção extensivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.

32, n. 2, p. 131 – 134, 2012. Disponível em: <
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100736X2012000200007&script=sci_arttext>. Acesso em: 14 mai. 2013.

D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Epidemiological study of enzootic bovine leukosis in Brazil: Short Communication. **Tropical Animal Health and Production**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 13 – 15, 1998. Disponível em :<
<http://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A%3A1005053124518>>. Acesso em: 25 fev. 2013.

DIGIACOMO, R. F.; DARLINGTON, R. L.; EVERMANN, J. F. Short Communications: Natural Transmission of Bovine Leukemia Virus in Dairy Calves by Dehorning. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Rockville Pike, v. 49, n. 3, p. 340 – 342, 1985. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1236184/>>. Acesso em: 29 jan. 2013.

DIVERS, T.J. et al. Evidence for transmission of bovine leukemia virus by rectal palpation in a commercial dairy herd. **Preventive Veterinary Medicine**, [s.l.], v. 23, n. 3 - 4, p. 133 – 141, 1995. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167587795004648>>. Acesso em: 22 jan. 2013.

HEMMATZADEH, F. Sequencing and phylogenetic analysis of gp51 gene of bovine leukaemia virus in Iranian isolates. **Veterinary Research Communications**, Holanda, v. 31, n. 6, p. 783 – 789, 2007. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17294262>>. Acesso em: 04 out. 2012.

INOUE, E. et al. Genetic heterogeneity among bovine leukemia viruses in Japan and their relationship to leukemogenicity. **Archives of Virology**, Austria, v.156, n. 7, p.1137-114, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21387204>>. Acesso em: 15 ago. 2012.

JACOBSEN, K. L. et al. Transmission of bovine leukemia virus: Prevalence of antibodies in precolostral calves. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, n. 1, p. 265-272, 1983.

Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167587783900314>>. Acesso em: 19 set. 2012.

JOHNSTON, E. R.; RADKE, K. The SU and TM Envelope Protein Subunits of Bovine Leukemia Virus Are Linked by Disulfide Bonds , both in Cells and in Virions. **Journal of virology**, Washington DC, v. 74, n. 6, p. 2930 – 2935, 2000. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC111788/>>. Acesso em: 05 fev. 2013.

JULIARENA, M. A. et al. Partial molecular characterization of different proviral strains of bovine leukemia virus. **Archives of virology**, Austria, v. 158, n. 1, p. 63 – 70, 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22965577>>. Acesso em: 09 fev. 2013.

KETTMANN, R. et al. Genomic integration of bovine leukemia provirus : Comparison of persistent lymphocytosis with lymph node tumor form of enzootic bovine leukosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 77, n. 5, p. 2577 – 2581, mai. 1980.

Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC349445/>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

LEUZZI JR, L. A.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Leucose enzoótica bovina e vírus da leucemia bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 22, n.2, p. 211-221, 2001. Disponível em:

<<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2055>>. Acesso em: 22 fev. 2013.

LICURSI, M. et al. Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. **Veterinary Microbiology**, [s.l.], v. 96, n. 1, p. 17 – 23, 2003. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113503002025>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

LOUGHRAN, T. P. Commentary, HTLV infection and hematologic malignancies. **Leukemia Research**, Grã Bretanha, v. 20, n.6, p. 457 – 458, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8709616>>. Acesso em: 04 out. 2012.

LUDERS, M. A. **Prevalência de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina em fêmeas com mais de dois anos no Rebanho de bovinos leiteiros no Município de Mafra-SC.** Lages, 2001, 30p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agroveterinária/Sanidade Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

MAMOUN, R. Z. et al. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. **Journal of Virology**, Whashington DC, v. 64, n. 9, p. 4180 – 4188, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC247882/>>. Acesso em: 17 jan. 2013.

MANET, G. et al. Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus* spp.). **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v.22, n. 3, p. 255 – 263, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2560857>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

MATSUMURA, K. et al. Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan. **Virus research**, Philidelphia, v. 155, n. 1, p. 343 – 348, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21095208>>. Acesso em: 13 jan. 2013.

MONTI, G.; SCHRIJVER, R.; BEIER, D. Genetic diversity and spread of Bovine leukaemia virus isolates in Argentine dairy cattle. **Archives of virology**, Austria, v. 150, n. 3, p.443 – 448, 2005. Disponível em :< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15592892>> . Acesso em: 15 mar. 2013.

MORAES, M. P. et al. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da Leucose Bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 2, 257-262, 1996. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v26n2/a15v26n2.pdf>>. Acesso em: 19 set. 2012.

MORATORIO, G. et al. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in South America reveals diversification in seven distinct genotypes. **Archives of virology**, Austria, v. 155, n. 4, p. 481 – 489, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169372> >. Acesso em: 09 ago. 2012.

RAJÃO, D., de S. **Efeito da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina na produção de leite e reprodução de rebanhos leiteiros**. Belo Horizonte, 2008, 26p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal / Medicina Veterinária Preventiva) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

RAVAZZOLO, A. P.; COSTA, U. M. Retroviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. 7 ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. 888p.

RODRIGUEZ, S. M. et al. Bovine leukemia virus can be classified into seven genotypes: evidence for the existence of two novel clades. **Journal of General Virology**, [s.l.], v. 90, p. 2788 – 2797, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587134>. Acesso em: 12 set. 2012.

SAGATA, N. et al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.82, n.3, p.677-681, 1985. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=397108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 12 jan. 2013.

STOKKA, G.L. et al. Bovine Leukosis. **Kansas State University**, Kansas, 1998. Disponível em: < <http://www.ksre.ksu.edu/bookstore/pubs/EP51.pdf> >. Acesso em: 20 abr. 2013.

TOSTES, R. A. Situação da Leucose Bovina no Brasil: uma revisão. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 1, n.1, p. 42 – 50, 2005. Disponível em: < <http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ca/article/viewFile/85/53> >. Acesso em: 05 jan. 2013.

TRAININ, Z. et al. Detrimental effect of bovine leukemia virus (BLV) on the immunological state of cattle. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 54, n. 1- 4, p. 293-302, 1996. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242796057066>; Acesso em: 15 abr. 2013.

WILLEMS, L. et al. Bovine Leukemia Virus, an Animal Model for the Study of Intrastrain Variability. **Journal of virology**, Washington DC, v. 67 , n. 2 , p. 1086 – 1089, 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380455> >. Acesso em: 08 nov. 2012.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Enzootic Bovine Leukosis**. 7ª ed., v. 1 e 2. Paris, 2012,1404 p.

ZHAO, X.; BUEHRING, G. C. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. **Virology**, Amsterdam, v. 366, n. 1, p. 150 – 165, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17498765>>. Acesso em: 03 mar. 2013.

ANEXOS**Anexo A – TE (Tris EDTA)**

Reagente	Fabricante	Catálogo	pm	Quantidade
Tris – HCl 1M pH8	Tris AMRESCO HCl	0826	121,14	1 mL
EDTA 0,5M pH8	AMRESCO	0105	372,24	0,2uL

*Quantidades para solução 100mL

pH: 8,0

Anexo B - Citrato de sódio 0,1M com 10% de etanol

Reagente	Fabricante	Catálogo	Quantidade
Citrato de sódio	SIGMA	71402	2,94g
Etanol	SIGMA	E7023	10mL

*Quantidades para 100mL de solução

Anexo C – TAE 1X**TAE 50X**

Reagente	Fabricante	Catálogo	pm	Quantidade
Tris base	AMRESCO	0826	121,14	24,2g
EDTA 0,5M pH8	AMRESCO	0105	372,24	10mL
Ácido acético glacial	SIGMA	A6283		5,71mL

*Quantidade para 100mL de solução

TAE 1X – Diluição

Reagente	Quantidade
TAE 50X	10mL
H2O	490mL

*Quantidade para 500mL de solução

Reagente	Quantidade
TAE 50X	20mL
H2O	980mL

*Quantidade para 1L de solução