

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ANNA CAROLINE PONTEL DE ALMEIDA**

**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA LEUCOSE  
BOVINA EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL**

**LAGES**

**2023**

**ANNA CAROLINE PONTEL DE ALMEIDA**

**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA LEUCOSE  
BOVINA EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Joandes Henrique Fontequê

Co-orientador: Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa

**LAGES**

**2023**

**ANNA CAROLINE PONTEL DE ALMEIDA**

**PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA LEUCOSE  
BOVINA EM BOVINOS LEITEIROS NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal, da  
Universidade do Estado de Santa Catarina,  
para obtenção do título de Mestre em  
Ciência Animal, área de concentração em  
Sanidade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Joandes Henrique  
Fonteque

Co-orientador: Prof. Dr. Ubirajara Maciel da  
Costa

**BANCA EXAMINADORA**

Membros:

Ubirajara Maciel da Costa, Dr.  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Carla Ivane Ganz Vogel, Dra.  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Paulo Augusto Esteves, Dr.  
Embrapa Suínos e Aves

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Pontel de Almeida, Anna Caroline  
PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA EM BOVINOS LEITEIROS NO  
ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL / Anna Caroline  
Pontel de Almeida. -- 2023.

37 p.

Orientador: Joandes Henrique Fonteque  
Coorientador: Ubirajara Maciel da Costa  
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2023.

1. Retrovirus. 2. Sequenciamento de Sanger. 3. PCR. I.  
Fonteque, Joandes Henrique. II. da Costa, Ubirajara Maciel. III.  
Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.  
IV. Título.

Dedico este trabalho para minha mãe,  
Josmari. Minha alma gêmea, meu exemplo,  
e minha primeira e melhor orientadora.

## AGRADECIMENTOS

Durante minha vida o apoio e carinho dos meus pais, Ivanor e Josmari, foram constantes. Entre idas e vindas, eis o que me falavam: “você sempre tem para onde voltar”. Por isso, e por infinitamente mais, todo meu amor. Nem que eu falasse todas as línguas, seria capaz de expressar minha admiração e meu agradecimento. Agradeço também a minha irmã Thais, a voz da razão em tantos momentos, por estar ao meu lado incansavelmente; e a minha avó Rita (Nona, Ritinha, Riri, Rita Maria...uma infinidade de apelidos carinhosos), *grazie mille* e um *bisou* desta neta que te ama incondicionalmente. Por último, mas nunca menos importante, obrigada a minha família pela parceria de sempre: Uilliam, Ivani, Dirceu, Rodrigo, Jorgina, Joice, Jocemar e Marcelo; e a minha amiga-irmã da vida inteira Aline.

A pós-graduação pode ser solitária, mas com um pouco de sorte alguns amigos surgem pelo caminho; e que sorte tive! Anthony, Loirana, Roberta, Marcela e Karol: vocês são cientistas incríveis e um futuro brilhante os espera, cada um em sua área de conhecimento. O sucesso já está garantido. Tenho muito orgulho de todos e da amizade que construímos. Só posso agradecê-los tendo a certeza de que esses dois anos teriam sido infinitamente mais difíceis sem vocês ao meu lado. Contem sempre comigo! Ketriane, Dhébora e Mariana, obrigada por serem minhas mentoras e tornarem-se amigas tão queridas.

Ao Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) por ter me acolhido e disponibilizado as instalações para que eu pudesse desenvolver este trabalho, e aos professores Dr. Ubirajara Maciel da Costa (Bira) e Dra. Sandra Ferraz, muito obrigada por me receberem com tanto carinho. Vocês são minha inspiração! Agradeço ao professor Dr. Joandes Henrique Fontequê e a professora Dra. Carla Ivane Ganz Vogel pela oportunidade. Por fim, agradeço o Programa de Bolsas de Monitoria de Pós-Graduação (PROMOP) pela concessão da bolsa de estudos e ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV UDESC).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Chamada CNPq/MCTI/FNDCT Nº 18/2021 pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do projeto; e a Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC) pelo fornecimento dos dados referentes as propriedades leiteiras do Estado de Santa Catarina por meio do TERMO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA Nº7921.

## RESUMO

O Vírus da Leucose Bovina (VLB) é o agente epidemiológico responsável por causar a Leucose Enzoótica Bovina, doença crônica e linfoproliferativa associada a perdas econômicas significativas na indústria pecuária. Assim como outros membros da família *Retroviridae*, faz transcrição reversa ao infectar as células integrando, assim, o genoma do hospedeiro. Por meio de análises moleculares, foi possível a identificação prévia de ao menos 11 genótipos circulantes; sendo que os genótipos 1, 4 e 6 são os mais prevalentes mundialmente. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência e a genotipagem do VLB em bovinos leiteiros no estado de Santa Catarina, Brasil. Foram colhidas amostras de 447 vacas leiteiras da raça Holandesa, provenientes de propriedades das seis mesorregiões do estado: Oeste, Vale do Itajaí, Sul, Planalto Norte, Serrana e Grande Florianópolis. As amostras de sangue passaram por extração e purificação de DNA, diagnóstico molecular por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genético pelo método de Sanger para identificação dos genótipos circulantes no estado. A prevalência total foi de 29%. Entre as mesorregiões, na Grande Florianópolis foi possível identificar a maior prevalência (60%), seguido da região Sul (46%), Vale do Itajaí (35%), Planalto Norte (30%), Oeste (27%) e Serrana (15%). As variantes de VLB encontradas nesse estudo estão classificadas nos genótipos 1 (Sul, Vale do Itajaí, Planalto Norte e Oeste), 6 (Vale do Itajaí, Oeste e Serrana) e 7 (Grande Florianópolis, Oeste e Serrana). Individualmente, cada genótipo é capaz de apresentar características únicas de transmissão e interação com o hospedeiro, e neste contexto a vigilância epidemiológica do VLB e suas variantes é essencial para a implementação de programas de monitoramento, controle e erradicação desses agentes em populações diversas.

Palavras-chave: Retrovirus. Sequenciamento de Sanger. PCR.

## ABSTRACT

Bovine Leukemia Virus (BLV) is the epidemiological agent responsible for causing Bovine Enzootic Leukosis, a chronic and lymphoproliferative disease associated with significant economic losses in the livestock industry. Like other members of the Retroviridae family, it undergoes reverse transcription upon cell infection, thus integrating into the host genome. Through molecular analysis, prior identification of at least 11 circulating genotypes has been possible, with genotypes 1, 4, and 6 being the most prevalent worldwide. The objective of this study was to determine the prevalence and genotype of BLV in dairy cattle in Santa Catarina, Brazil. Samples from 447 dairy Holstein cows were collected from properties in the six mesoregions of the state: West, Itajaí Valley, South, Northern Highlands, Highlands, and Great Florianópolis. Blood samples were subjected to DNA extraction and purification, molecular diagnosis using polymerase chain reaction (PCR), and Sanger sequencing to identify the genotypes present in the state. The total prevalence rate was 29%. Among the mesoregions, in Great Florianópolis, it was possible to identify the highest prevalence (60%), followed by the South (46%), Itajaí Valley (35%), Northern Highlands (30%), west (27%), and highlands (15%). The strains described in this study were classified into genotypes 1 (South, Itajaí Valley, Northern Highlands, and West), 6 (Itajaí Valley, West, and Highlands), and 7 (Great Florianópolis, West, and Highlands). Individually, each genotype is capable of showing unique characteristics of transmission and interaction with the host, and epidemiological vigilance of BLV and its strains is essential for the implementation of monitoring, control, and eradication programs of this agent in different populations.

Key-words: Retrovirus. Sanger Sequencing. PCR.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Genótipos do Vírus da Leucose Bovina circulantes nas Américas obtidos por sequenciamento genético e RFLP, adaptado de Polat et al. (2017). .....26

**Tabela 2.** Prevalência do Vírus da Leucose Bovina (VLB) por meio de diagnóstico por PCR em bovinos leiteiros da raça Holandesa no estado de Santa Catarina, Brasil, de acordo com cada mesorregião. Demonstra o número total de amostras coletadas, os positivos e a relação ao número total de amostras (n=447). .....37

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Árvore filogenética construída com o método de máxima verossimilhança com o modelo de Tamura-Nei, por meio dos algoritmos de Neighbor-Join e BioNJ no software MEGA 11. Esta análise envolveu 23 sequências de nucleotídeos, das quais seis são sequências previamente depositadas no Genbank e 17 obtidas neste estudo por sequenciamento de Sanger. .... **Erro! Indicador não definido.**

**Figura 2.** Histograma demonstrando a prevalência dos genótipos 1, 6 e 7 por mesorregião no estado de Santa Catarina, baseado em 90 sequências de nucleotídeos obtidas neste estudo. ..40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

VLB	Vírus da Leucose Bovina
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
HTLV - I	Vírus Linfotrópico Humano tipo I
HTLV – II	Vírus Linfotrópico Humano tipo II
RVE	Retrovírus endógeno
LTR	Long Terminal Repeats
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
NGS	Next Generation Sequencing
LEB	Leucose Enzoótica Bovina
BoLA	Antígeno Leucocitário Bovino
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase qualitativa em tempo real

## SUMÁRIO

## 1. INTRODUÇÃO

A família *Retroviridae* inclui vírus amplamente distribuídos na natureza, que são associados a uma variedade de doenças em vertebrados. Esta família é dividida em duas subfamílias: *Spumaretroviridae* e *Orthoretroviridae*, que possuem características distintas quanto a sequências de aminoácidos e ciclo de replicação. Embora os membros da subfamília *Spumaretroviridae* não tenham sido associados a doenças até o momento, os retrovírus da subfamília *Orthoretroviridae* são implicados como causadores de doenças importantes, como tumores e disfunções imunológicas e neurológicas em animais e humanos (COFFIN et al., 2021).

O Vírus da Leucose Bovina (VLB) pertence à família *Retroviridae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. Infecta naturalmente bovinos, mas já foi identificado em outras espécies, como bubalinos e ovinos. O genoma do VLB é composto por RNA de fita simples (ssRNA), e ao entrar na célula hospedeira, faz transcrição reversa e integra seu material genético ao do hospedeiro. O genoma viral codifica proteínas estruturais e enzimas que são necessárias para a replicação viral, e possui três genes principais *gag*, *pol* e *env* (JOHNSON, 2019).

O VLB apresenta diversos genótipos identificados com base em sequenciamento genético, sendo os genótipos 1, 4 e 6 os mais prevalentes globalmente. Sua disseminação ocorre principalmente por meio do comércio internacional de animais reprodutores. A transmissão do VLB pode ocorrer de forma horizontal, por meio do contato entre animais infectados e saudáveis; e de forma vertical, por transmissão intrauterina (POLAT et al., 2017).

Este trabalho aborda a descrição e estrutura do genoma viral, assim como a prevalência de VLB em rebanhos leiteiros de Santa Catarina, descrevendo quais genótipos estão presentes no estado. Compreender estes aspectos é fundamental para o monitoramento dessa importante doença em animais de produção, para fins de controle epidemiológico veterinário.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar a prevalência e a genotipagem do Vírus da Leucose Bovina em rebanhos bovinos no estado de Santa Catarina.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 2.2.1** Determinar a prevalência do Vírus da Leucose Bovina em rebanhos leiteiros da raça Holandesa nas seis mesorregiões do estado de Santa Catarina.
- 2.2.2** Determinar em rebanhos leiteiros da raça Holandesa quais os genótipos do Vírus da Leucose Bovina são os mais prevalentes nas seis mesorregiões do estado de Santa Catarina.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 FAMÍLIA *Retroviridae*

Retrovírus estão difundidos na natureza, podem ser encontrados em muitos vertebrados, e são associados a uma variedade de doenças, incluindo tumores de origem mesodermal como linfomas e sarcomas, carcinomas mamários e hepáticos, imunodeficiências e doenças autoimunes (JOHNSON, 2019). A família *Retroviridae* é dividida em duas subfamílias: *Spumaretrovirinae* e *Orthoretrovirinae* baseado em quando ocorre a transcriptase reversa no ciclo de replicação, na comparação de sequências de aminoácidos da proteína *Pol*, da presença ou ausência de subdomínios na proteína *Gag*, e (COFFIN et al., 2021).

Os membros da subfamília *Spumaretrovirinae* estão divididos em cinco gêneros: *Bovispumavirus*, *Equispumavirus*, *Felispumavirus*, *Prosimiispumavirus* e *Simiispumavirus*. São encontrados em mamíferos, porém transmissões de caráter zoonótico são raras, sendo que o evento de transmissão entre humanos nunca foi relatado. A subfamília recebe esse nome devido a característica apresentada por muitos isolados de formar espuma em culturas celulares. Até o momento, nenhuma doença foi associada a membros desta subfamília (KHAN et al., 2018).

Já subfamília *Orthoretrovirinae* compreende seis gêneros: *Alpharetrovirus* - o Vírus da Leucose Aviária é associado a doenças debilitantes e osteopetrosis em aves e mamíferos (LI et al., 2013); *Betaretrovirus* - em primatas, os vírus exógenos causam imunodeficiências, e em ovinos o vírus Jaagsiekte é responsável por acometer os animais com adenocarcinoma pulmonar (HOFACRE; FAN, 2010); *Deltaretrovirus* - do qual faz parte o Vírus da Leucose Bovina, estão associados a linfomas de células T e B e manifestações neurológicas, como paraparesia espástica tropical (GILLET et al., 2007); *Epsilonretrovirus* - acomete peixes, porém este gênero não é tão estudado quanto os outros (PAUL et al., 2006); *Gammaretrovirus* - associados à imunossupressão e manifestações neurológicas, como o Vírus da Imunodeficiência Felina (HARTMANN, 2012); *Lentivirus* - membros deste gênero não possuem potencial oncogênico, porém estão associados a desordens imunológicas e neurológicas, como o Vírus da Anemia Infecciosa Equina (JARA et al., 2020).

Todos os retrovírus possuem genoma similar, formado pelos genes *Gag*, que codifica proteínas estruturais; *Pro*, que codifica a protease viral; *Pol*, que codifica as enzimas transcriptase reversa e integrase; e *Env*, que codifica as glicoproteínas de superfície do envelope e facilitam a entrada dos vírus nas células hospedeiras. Após a endocitose, passam a ser

chamados de pró-vírus. Estes contêm cópias de RNA viral que sofrem transcrição reversa e formam uma molécula de DNA dupla-fita (dscDNA). A enzima integrase corta as extremidades 3' do cDNA para que possa ser integrado ao genoma do hospedeiro. O DNA viral é transcrito pela maquinaria da célula hospedeira, que reconhece este material genético como sendo seu. O mRNA viral é liberado para o citoplasma para ser transcrito em proteínas. O provírus resultante contém promotores e elementos regulatórios necessários para a replicação e transcrição viral (JOHNSON, 2019). A descoberta de que essa família era capaz de utilizar uma molécula de RNA para sintetizar uma fita complementar de DNA (cDNA) revolucionou os estudos em biologia, pois esta descoberta desafiou o dogma central que prevalecia em biologia molecular que postulava que DNA é transcrito em RNA, que então é traduzido em proteína (MENÉNDEZ-ARIAS et al., 2017).

Até o momento, os retrovírus que infectam mamíferos são os mais estudados baseados em modelos específicos, como camundongos, animais de produção e de companhia; e as potenciais conexões com desenvolvimento de tumores e doenças autoimunes despertam interesse considerável em cientistas. Alguns retrovírus de importância veterinária são semelhantes aos que afetam humanos, como o Vírus da Leucemia Felina que é capaz de fornecer modelos importantes para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (JOHNSON, 2019).

### 3.2 VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB)

#### *Estrutura e características do genoma viral*

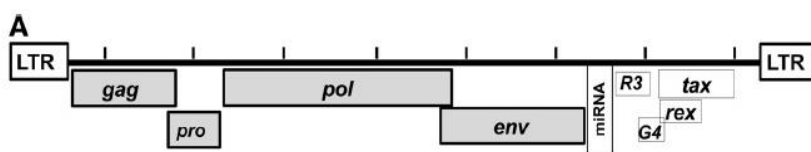
O Vírus da Leucose Bovina (VLB) pertence à família *Retroviridae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. Infecta naturalmente bovinos (*Bos taurus*, *Bos indicus*) e bubalinos (*Bubalus bubalis*). O VLB está intimamente relacionado ao Vírus T Linfotrópico Humano (HTLV) tipo I, associado a paraparesia espástica tropical/mielopatia, e tipo II que possui patogenia menos conhecida e é considerado uma forma ancestral de infecção (VIEIRA et al., 2021).

O genoma do VLB é constituído por aproximadamente 8714 nucleotídeos em RNA fita simples (ssRNA), que assim como os outros retrovírus, faz transcrição reversa ao entrar na célula-alvo, integrando seu material genético ao do hospedeiro, e passa a ser chamado de retrovírus endógeno (RVE). O provírus resultante contém elementos promotores e regulatórios que transcrevem o RNA viral, e codificam todas as proteínas estruturais e enzimas necessárias

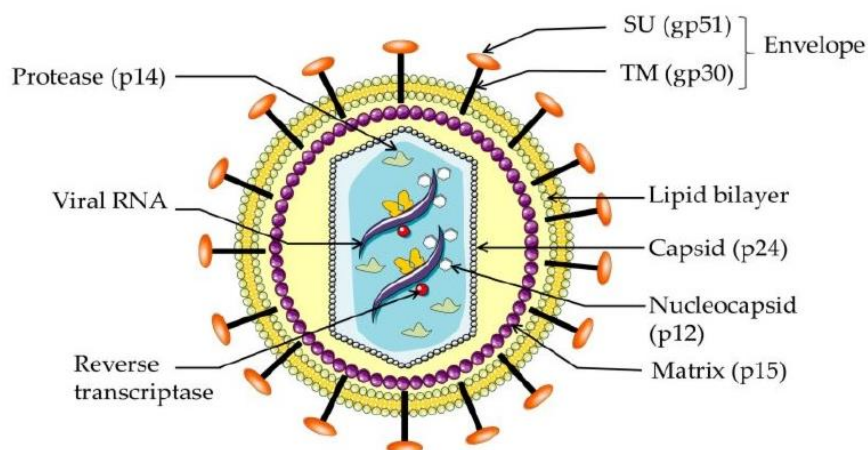
para replicação, são estes os genes *gag*, *pro*, *pol* e *env*. Tais genes codificam as proteínas estruturais internas do vírion, a protease viral, a transcriptase reversa e as glicoproteínas do envelope, respectivamente. Embora muito semelhantes, os genomas do VLB e HTLV-1 são diferentes, uma vez que cada um destes vírus possui sequências únicas chamadas de pX situadas entre o gene *env* e a *LTR3'* (SAGATA et al., 1985; AIDA et al., 2013 JOHNSON, 2019).

Durante o processo de replicação viral o gene *gag* é traduzido como o precursor da proteína Pr45 *Gag*, que dá origem a três proteínas maduras: a proteína de matriz p15, que atua sobre o RNA viral e interage com a bicamada lipídica do envelope viral; a proteína do capsídeo p24, que é o principal alvo da resposta imune do hospedeiro; e a proteína do nucleocapsídeo p12 que liga o RNA genômico enovelado (BOSO et al., 2021).

Também muito importante no processo de replicação viral, o gene *env* está presente no envelope viral, e compreende a proteína transmembrana *gp30* e a proteína de superfície *gp51*, que atua na neutralização de anticorpos para facilitar a entrada do vírus na célula hospedeira. Devido ao seu caráter imunogênico e à presença dos epítomos conformacionais F, G e H localizados na metade N-terminal da proteína, o sequenciamento genético da *gp51* é utilizado em estudos filogenéticos (MAMOUN et al., 1990; HAMADA et al., 2020).



**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura do genoma do Vírus da Leucose Bovina (VLB), dos genes estruturais e enzimáticos *gag*, *pro*, *pol* e *env*, bem como os genes regulatórios *tax* e *rex*, e genes acessórios *R3* e *G4* (A). (POLAT et al., 2017).



**Figura 2.** Representação esquemática do Vírus da Leucose Bovina (VLB) (MARAWAN et al., 2021).

O vírus codifica ao menos quatro proteínas regulatórias: Tax, G4, Rex e R3 (OHNUKI et al., 2021). Durante a replicação viral, a proteína Tax ativa a transcrição do promotor LTR por meio de um processo que envolve o recrutamento de complexos do fator de transcrição e da proteína de ligação do elemento responsivo (ATF/CREB); enquanto a proteína Rex é responsável pela regulação pós-transcricional da expressão gênica viral. As proteínas Tax e Rex são essenciais para o potencial de infecção do vírus, segundo estudos feitos por meio de genética reversa (KANNO et al., 2023).

A proteína G4 regula a produção viral de modo positivo, e sua ação está relacionada à liberação de partículas virais, diferente do efeito da proteína Tax que atua em fases distintas no ciclo de vida do VLB, sendo ambas críticas para a síntese de novos vírions. Genótipos distintos de VLB foram identificados por substituição de aminoácidos na proteína G4 (POLAT et al., 2016), indicando que tais polimorfismos podem mudar os níveis de patogenicidade e transmissibilidade do VLB (MURAKAMI et al., 2017).

### *Identificação de genótipos*

Muitos métodos foram utilizados para caracterização genética do VLB, como a clivagem de produtos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com enzimas de restrição (REA-PCR). Utilizando esta metodologia, foi possível classificar os genótipos de acordo com a região geográfica que foram isolados, como VLB tipo Argentino, ou referenciando o cluster filogenético. Com a ascensão de sequenciamento de Sanger, que tem como estratégia básica a interrupção da síntese da cadeia complementar pela incorporação de um dideoxinucleotídeo marcado com diferentes tipos de fluoróforos (SANGER e COULSON, 1977), e os sequenciamentos de nova geração (Next Generation Sequencing - NGS) (POLAT et al., 2017).

Devido ao comércio internacional de animais reprodutores, o VLB disseminou-se por todos os continentes e, embora os níveis de infecção variem entre países e suas regiões, atualmente este vírus encontra-se mundialmente prevalente em bovinos. Ao menos 11 genótipos de VLB foram identificados por meio de sequenciamento e análises filogenéticas do gene *gp51*. Utilizando esta abordagem foi possível verificar que os genótipos 1, 4 e 6 são os mais prevalentes mundialmente (HAMADA et al., 2020). Destes, o genótipo 1 é o mais dominante, possui o maior potencial de contaminação e pode ser encontrado em quase todos os continentes. Na América Latina, os genótipos 1, 2, 4, 5, 6 e 9 são comuns. O genótipo 4 pode ser encontrado na América Latina e Europa, porém neste último sua prevalência decaiu devido à programas de controle e erradicação de VLB. O genótipo 6 é originário da América Latina, e foi inserido na Ásia por meio do comércio animal. Somente o genótipo 2 é restrito a América Latina, e o genótipo 5 é encontrado no Brasil em áreas geográficas próximas onde o comércio internacional de animais é possível nas fronteiras, diferentemente do genótipo 7 que é encontrado em regiões dispersas (POLAT et al., 2017).

No Brasil, circulam predominantemente os genótipos 1, 2, 5, 6 e 7 (Tabela 1). Individualmente, cada genótipo é capaz de apresentar características únicas de interação com o organismo hospedeiro, daí a importância de monitorar a origem de novas variantes para controle epidemiológico veterinário (POLAT et al., 2016; GREGORY et al., 2017).

**Tabela 1.** Genótipos do Vírus da Leucose Bovina, obtidos por sequenciamento genético e RFLP, circulantes nas Américas, adaptado de Polat et al. (2017).

PAÍS	GENÓTIPO	REFERÊNCIA
USA	1/ 3/ 4	DERSE et al., 1985; MAMOUN et al., 1990; ZHAO&BUEHRING, 2007
Caribe	1	YANG et al., 2016
Costa Rica	1 /5	ZHAO&BUEHRING, 2007
Argentina	1/2/4/6	DUBE et al., 2000; LICURSI et al., 2003;
Brasil	1/2/5/6/7	CAMARGOS et al., 2007; MORATORIO et al., 2010
Chile	4/7	FELMER et al., 2005
Bolívia	1/2/6/9	POLAT et al., 2016

Peru	1/2/6	POLAT et al., 2016
Paraguai	1/2/6	POLAT et al., 2016
Uruguai	1	MORATORIO et al., 2010

### *Transmissão*

O VLB é transmitido por linfócitos infectados, de maneira horizontal ou vertical. Destas, a transmissão horizontal é a mais importante, podendo ocorrer pelo contato entre o sangue de animais infectados com animais saudáveis, ou por meio de secreção nasal e saliva (YUAN et al., 2015), ou pela via iatrogênica quando não há troca de luva para palpação retal, seringas e agulhas (KOHARA et al., 2006). Insetos e artrópodes também foram identificados como potenciais transmissores do vírus (ERSKINE et al., 2012). A presença de VLB no sêmen é controversa (BENITEZ et al., 2019), reforçando que somente é fonte de infecção quando contaminado com linfócitos infectados (HOPKINS e DIGIACOMO, 1997). Dessa forma, acredita-se que a transmissão durante a reprodução seja possível na cobertura natural onde ocorrem micro lesões na mucosa e depende da carga viral (MEKATA et al., 2018; BENITEZ et al., 2019; KUCZEWSKI et al., 2021).

A transmissão vertical pode ocorrer por colostro e leite, e por via intrauterina. A carga proviral é um fator importante a ser considerado neste tipo de transmissão (MEKATA et al., 2015; SAIJIKI et al., 2017).

## **3.3 LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA**

A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) é uma doença infectocontagiosa de caráter crônico e linfoproliferativo que ocorre naturalmente em bovinos. É responsável por perdas econômicas significativas na indústria pecuária, uma vez que reduz a produção de leite, a eficiência produtiva e a longevidade dos animais, além de acarretar condenações de carcaça em frigoríficos (RUIZ et al., 2018).

A origem viral desta doença foi descrita por Miller et al. (1969), que ao cultivar *in vitro* linfócitos de bovinos que apresentavam linfocitose persistente, perceberam a presença de

partículas virais visíveis em microscopia eletrônica. O agente etiológico da LEB é o Vírus da Leucose Bovina, retrovírus oncogênico previamente descrito.

O VLB tem tropismo por células B porém, pode infectar outras populações celulares tais como células B CD5<sup>+</sup> IgM<sup>+</sup> e CD5<sup>-</sup> IgM<sup>+</sup>, e células T CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e  $\gamma/\delta$ , monócitos e granulócitos em sangue periférico e em tecidos linfoides. Ao infectá-las, integra-se ao genoma do hospedeiro permanentemente (BLAGITZ et al., 2017)

Em bovinos, a expansão policlonal de células B ocorre quase que exclusivamente em células CD5<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>B, que é característico de animais com linfocitose persistente. Esta proliferação celular pode ocorrer em diversos órgãos e tecidos, como baço, fígado, coração, abomaso, útero e linfonodos e, embora a doença não produza sinais clínicos específicos, estes tumores podem desenvolver defeitos incompatíveis com a vida dependendo do órgão afetado. Raramente o vírus é detectado de modo livre *in vivo*, e acredita-se que isso somente seja possível durante o estágio agudo da infecção antes do desenvolvimento de anticorpos específicos (BLAGITZ et al., 2017).

A maioria dos animais infectados são portadores assintomáticos do vírus. Destes, aproximadamente 40% desenvolvem linfocitose persistente, e apenas 5% destes desenvolvem linfossarcoma que pode ocorrer entre 1 e 8 anos após a infecção, devido à característica dos deltaretrovírus de apresentarem longo período de incubação. Durante a linfocitose persistente os animais podem ser acometidos por infecções oportunistas e desenvolver sinais clínicos secundários, como mastite (BENITEZ et al., 2020).

Entender os mecanismos de patogênese é imprescindível para desenvolver estratégias terapêuticas e preventivas contra a disseminação do VLB. As metodologias incluem teste e eliminação de animais positivos de rebanhos, que provou ser eficiente em curto período na Europa; e seleção de animais portadores do antígeno leucocitário bovino (BoLA), que pertence ao complexo principal de histocompatibilidade, e garante resposta imune e resistência hereditária à infecção por VLB (RODRIGUEZ et al., 2011). Dessa forma, países como Dinamarca, Finlândia, Suíça e Holanda tornaram-se completamente livres da doença (POLAT et al., 2017).

Em contrapartida, a Ásia e a América do Norte demonstram altos índices de animais positivos. Na América do Sul, a Argentina apresenta a maior prevalência com 90% de positivos, enquanto no Brasil é possível observar prevalências entre 17,1 e 60,8% (POLAT et al., 2017). Em Santa Catarina, o estudo mais recente demonstrou que 42,1% dos bovinos

leiteiros de diferentes raças analisados eram soropositivos para VLB e há circulação de ao menos cinco genótipos diferentes no estado, sendo a região da Serra a mais afetada (68,3%) (RODAKIEWICZ et al., 2018).

A produção de agentes imunogênicos contra retrovírus é extremamente difícil devido às constantes variações genéticas dos patógenos. Várias tentativas foram realizadas utilizando vacinas recombinantes, com vírus inativado, com subunidades virais, com derivados celulares e com peptídeos sintéticos (RODRIGUEZ et al., 2011). Estas tentativas mostraram-se falhas devido ao estímulo a curto prazo do sistema imune do hospedeiro. Archilla et al. (2022) foram capazes de produzir vacina utilizando cepas atenuadas do vírus com deleção de genes dispensáveis para a infecciosidade porém, importantes para replicação viral; no entanto, a produção em larga escala e distribuição ainda se apresentam como um desafio.

As metodologias desenvolvidas para diagnóstico da Leucose Enzoótica Bovina podem ser classificadas em dois grupos: testes sorológicos indiretos, nos quais anticorpos reconhecem a proteína do capsídeo p24 codificada pelo gene *gag* e a proteína extracelular gp51 codificada pelo gene *env-gp51* (BAI et al., 2015); e testes moleculares por meio de PCR convencional, nested PCR e RT-qPCR, onde é possível obter amplificação de várias regiões do genoma viral, incluindo os genes *gag*, *pol*, *env* e *tax* (POLAT et al., 2016).

Neste contexto, a pesquisa contínua sobre a epidemiologia, patogênese e desenvolvimento de agentes imunogênicos em retrovírus é essencial, tanto para a saúde animal quanto humana, bem como para a implementação de programas de monitoramento, controle e erradicação desses agentes em populações diversas.

### 3.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDA, Y. et al. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 328, pg. 1-11, 2013.
- ARCHILLA, G.S. A safe and effective vaccine against bovine leukemia virus. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 980514, pg. 1-9, 2022.
- BAI, L. et al. Identification and characterization of common B cell epitope in bovine leukemia virus via high-throughput peptide screening system in infected cattle. **Retrovirology**, v. 12, n. 1, pg. 1-14, 2015.
- BENITEZ, O.J. et al. Breeding bulls as a potential source of bovine leukemia virus transmission in beef herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 254, n. 11, pg. 1-6, 2019.
- BENITEZ, O. J. et al. Impact of bovine leukemia virus infection on beef cow longevity. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 181, pg. 1-18, 2020.
- BLAGITZ, M. G. et al. Immunological implications of bovine leukemia virus infection. **Research in Veterinary Science**, v. 114, pg. 109–116, 2017.
- BOSO, G. et al. The Oldest Co-opted Gag Gene of a Human Endogenous Retrovirus Shows Placenta-Specific Expression and Is Upregulated in Diffuse Large B-Cell Lymphomas. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 12, pg. 5453–5471, 2021.
- BUEHRING, G.C. et al. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 5, pg. 772-782, 2014.
- COFFIN, J. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Retroviridae 2021. **Journal of General Virology**, v. 102, n. 12, pg. 1-2, 2021.
- CAMARGOS, M.F. et al. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of bovine leukemia virus. **Virus Genes**, v. 34, pg. 343-350, 2007.
- DELARMELINA, E. et al. High positivity values for bovine leukemia virus in human breast cancer cases from Minas Gerais, Brazil. **PLoS ONE**, v. 15, n. 10, pg. 1-7, 2020.
- DERSE, D. et al. Bovine leukemia virus long terminal repeat: a cell type-specific promoter. **Science**, v. 227, n. 4684, pg. 317-320, 1985.
- DUBE, S. et al. The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. **Virology**, v. 277, n. 2, pg. 379-386, 2000.
- ERSKINE, R.J. et al. Herd-level determinants of bovine leukemia virus prevalence in dairy farms. **Journal of Dairy Research**, v. 79, n. 4, pg. 445-450, 2012.
- FELMER, R. et al. Molecular analysis of a 444bp fragment of the bovine leukemia virus gp 51 env gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. **Veterinary Microbiology**, v. 108, n. 1-2, pg. 39-47, 2005.

- GILLET, N. et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: Prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, v. 4, n. 18, pg. 1-32, 2007.
- GREGORY, L. et al. Bovine leukaemia virus genotypes 5 and 6 are circulating in cattle from the state of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 12, pg. 1790–1797, 2017.
- HAMADA, R. et al. Detection and Molecular Characterization of Bovine Leukemia Virus in Egyptian Dairy Cattle. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, pg. 1-26., 2020.
- HARTMANN, K. Clinical aspects of feline retroviruses: A review. **Viruses**, v. 4, pg. 2684-2710, 2012.
- HOFACRE, A.; FAN, H. Jaagsiekte sheep retrovirus biology and oncogenesis. **Viruses**, v. 2, pg. 2618-2648, 2010.
- HOPKINS, S.G.; DIGIACOMO, R.F. Natural transmission of bovine leucemia virus in dairy and beef cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 1, pg. 107-128, 1997.
- JARA, M.; FRIAS-DE-DIEGO, A.; MACHADO, G. Phylogeography of Equine Infectious Anemia Virus. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, n. 127, pg. 1-28, 2020.
- JOHNSON, W. E. Origins and evolutionary consequences of ancient endogenous retroviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, pg. 355-370, 2019.
- KHAN, A. S. et al. Spumaretroviruses: Updated taxonomy and nomenclature. **Virology**, v. 516, pg. 158-164, 2018.
- KHATAMI, A. et al. Bovine Leukemia virus (BLV) and risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis of case-control studies. **Infectious Agents and Cancer**, v. 15, n. 48, pg. 1-8, 2020.
- KOHARA, J. et al. Experimental transmission of Bovine Leukemia Virus in cattle via rectal palpation. **Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 1, pg. 25-30, 2006.
- KUCZEWSKI, A. et al. Invited review: Bovine leukemia virus—Transmission, control, and eradication. **Journal of Dairy Science**, v. 104, pg. 6358-6375, 2021.
- LI, D. et al. Avian leukosis virus subgroup A and B infection in wild birds of Northeast China. **Veterinary Microbiology**, v. 163, n. 3–4, pg. 257–263, 2013.
- LICURSI, M. et al. Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 96, n. 8, pg. 17-23, 2003.
- 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**, v. 64, n. 9, pg. 4180-4188, 1990.
- MEKATA, H. et al. Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 9, pg. 1115-1120, 2015.

- MENÉNDEZ-ARIAS, L.; SEBASTIÁN-MARTÍN, A.; ÁLVAREZ, M. Viral reverse transcriptases. **Virus Research**, v. 234, pg. 153-176, 2017.
- MILLER, J.M. et al. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte culture with reference to bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, pg. 1297-1305, 1969.
- MORATORIO, G. et al. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in Sotuh America reveals diversification in seven distinct genotypes. **Archives in Virology**, v. 155, pg. 481-489, 2010.
- MURAKAMI, H. et al. Bovine leukemia virus G4 enhances virus production. **Virus Research**, v. 238, pg. 213–217, 2017.
- OHNUKI, N. et al. A target enrichment high throughput sequencing system for characterization of BLV whole genome sequence, integration sites, clonality and host SNP. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, pg. 1-12, 2021.
- PAUL, T. A. et al. Identification and Characterization of an Exogenous Retrovirus from Atlantic Salmon Swim Bladder Sarcomas. **Journal of Virology**, v. 80, n. 6, pg. 2941–2948, 2006.
- POLAT, M. et al. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. **Retrovirology**, v. 13, n. 1, pg. 1-23, 2016.
- POLAT, M.; TAKESHIMA, S. N.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology Journal**, v. 14, n. 209, pg. 1-16, 2017.
- RODAKIEWICZ, S. M. et al. Heterogeneity determination of bovine leukemia virus genome in Santa Catarina state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, pg. 1-7, 2018.
- RODRIGUEZ, S.M. et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. **Viruses**, v. 3, n. 7, pg. 1210-1248, 2011.
- RUIZ, V. et al. Bovine Leukemia virus infection in neonatal calves. risk factors and control measures. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, n. 267, pg. 1-7, 2018.
- SAGATA, N. et al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, pg. 677-681, 1985.
- SAJIKI, Y. et al. Intrauterine infection with bovine leukemia virus in pregnant dam with high viral load. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 12, pg. 2036-2039, 2017.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, n. 12, pg. 5463-5467, 1977.
- VIEIRA, B. A. et al. Prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 and 2 (HTLV-1/-2) infection in pregnant women in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, pg. 1-10, 2021.
- YANG, Y. et al. First molecular characterization of bovine leukemia virus infections in the Caribbean. **PLoS One**, v. 11, n. 12, pg. 1-12, 2016.

YUAN, Y. et al. Detection of the BLV provirus from nasal secretion and saliva samples using BLV-CoCoMo-qPCR-2: Comparison with blood samples from the same cattle. **Virus Research**, v. 210, pg. 248-25, 2015.

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

#### **4. ARTIGO – DETECÇÃO DOS GENÓTIPOS 1, 6 E 7 DO VÍRUS DA LEUCOSE BOVINA (VLB) NO ESTADO DE SANTA CATARINA, BRASIL**

##### **RESUMO**

O Vírus da Leucose Bovina (VLB) é o agente epidemiológico responsável por causar a Leucose Enzoótica Bovina (LEB), doença crônica e linfoproliferativa associada a perdas econômicas significativas na indústria pecuária. Por meio de análises moleculares, foi possível a identificação prévia de ao menos 11 genótipos circulantes; sendo que os genótipos 1, 4 e 6 são os mais prevalentes mundialmente. O objetivo deste trabalho foi determinar a prevalência e a genotipagem do VLB em bovinos leiteiros no estado de Santa Catarina, Brasil. Para tanto, foram colhidas amostras de 447 vacas leiteiras da raça Holandesa, provenientes de propriedades das seis mesorregiões do estado: Oeste, Vale do Itajaí, Sul, Planalto Norte, Serrana e Grande Florianópolis. Amostras de sangue passaram por extração e purificação de DNA, diagnóstico por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genético pelo método de Sanger para identificação dos genótipos circulantes no estado. Como resultado foi possível observar que a prevalência do VLB foi de 29% (130/447). Entre as mesorregiões, na Grande Florianópolis foi possível identificar a maior prevalência (60%), seguido da região Sul (46%), Vale do Itajaí (35%), Planalto Norte (30%), Oeste (27%) e Serrana (15%). As variantes de VLB encontradas nesse estudo estão classificadas nos genótipos 1 (Sul, Vale do Itajaí, Planalto Norte e Oeste), 6 (Vale do Itajaí, Oeste e Serrana) e 7 (Grande Florianópolis, Oeste e Serrana). Individualmente, cada genótipo é capaz de apresentar características únicas de transmissão e interação com o hospedeiro e, neste contexto, a vigilância epidemiológica do VLB e suas variantes é essencial para a implementação de programas de monitoramento, controle e erradicação desses agentes em populações diversas.

Palavras-chave: Retrovirus. Sequenciamento de Sanger. PCR.

## ABSTRACT

Bovine Leukemia Virus (BLV) is the epidemiological agent responsible for causing Bovine Enzootic Leukosis, a chronic and lymphoproliferative disease associated with significant economic losses in the livestock industry. Like other members of the Retroviridae family, it undergoes reverse transcription upon cell infection, thus integrating into the host genome. Through molecular analysis, prior identification of at least 11 circulating genotypes has been possible, with genotypes 1, 4, and 6 being the most prevalent worldwide. The objective of this study was to determine the prevalence and genotype of BLV in dairy cattle in Santa Catarina, Brazil. Samples from 447 dairy Holstein cows were collected from properties in the six mesoregions of the state: West, Itajaí Valley, South, Northern Highlands, Highlands, and Great Florianópolis. Blood samples were subjected to DNA extraction and purification, molecular diagnosis using polymerase chain reaction (PCR), and Sanger sequencing to identify the genotypes present in the state. The total prevalence rate was 29%. Among the mesoregions, in Great Florianópolis, it was possible to identify the highest prevalence (60%), followed by the South (46%), Itajaí Valley (35%), Northern Highlands (30%), west (27%), and highlands (15%). The strains described in this study were classified into genotypes 1 (South, Itajaí Valley, Northern Highlands, and West), 6 (Itajaí Valley, West, and Highlands), and 7 (Great Florianópolis, West, and Highlands). Individually, each genotype is capable of showing unique characteristics of transmission and interaction with the host, and epidemiological vigilance of BLV and its strains is essential for the implementation of monitoring, control, and eradication programs of this agent in different populations.

Key-words: Retrovirus. Sanger Sequencing. PCR.

## 4.1 INTRODUÇÃO

O Vírus da Leucose Bovina (VLB) pertence à família *Retroviridae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. Infecta naturalmente bovinos (*Bos taurus* e *Bos indicus*) e bubalinos (*Bubalus bubalis*) e está intimamente relacionado aos vírus linfotrópicos humanos do tipo I e II (HTLV-I e II) (JOHNSON, 2019). O VLB é o agente etiológico da Leucose Enzoótica Bovina (LEB), doença infectocontagiosa de caráter crônico e linfoproliferativo que acomete os bovinos. É responsável por acarretar perdas econômicas significativas para indústria pecuária, pois reduz a produção de leite, a eficiência produtiva, a longevidade dos animais e leva a condenações de carcaça em frigoríficos (RUIZ et al., 2018).

Devido ao comércio internacional de animais reprodutores, o VLB se disseminou por todos os continentes e, embora os níveis de infecção variem entre países e suas regiões, o VLB é mundialmente prevalente em bovinos. Ao menos 11 genótipos de VLB já foram identificados por meio de sequenciamento genético e análises filogenéticas do gene *env51*. Destes, os genótipos 1, 4 e 6 são os mais prevalentes mundialmente (HAMADA et al, 2020).

Na América Latina, a Argentina é o país que apresenta os maiores índices de animais positivos para VLB, e os genótipos 1, 2, 4 e 6 foram identificados por RFLP e sequenciamento genético. No Paraguai e Uruguai, o genótipo 1 é predominante (MORATORIO et al., 2010). Na Bolívia, além dos genótipos 1, 2 e 6, o genótipo 9 foi descrito pela primeira vez por meio de sequenciamento de nova geração (NGS) (POLAT et al., 2016). No Brasil, a prevalência de VLB em rebanhos é altamente variável, entre 4,8% e 60% (D'ANGELINO et al., 2013; CAMARGOS et al., 2007), e circulam predominantemente os genótipos 1, 2, 5, 6 e 7 (POLAT et al, 2017; GREGORY et al., 2017). Em Santa Catarina, a variabilidade genética do VLB determinada por meio da técnica de RFLP, que constatou que cinco genótipos estavam circulando no estado, sendo o genótipo 10 o mais prevalente e o genótipo 1 o menos prevalente (RODAKIEWICKZ et al., 2018).

Neste estudo, determinamos a prevalência do VLB em rebanhos leiteiros em Santa Catarina e as variantes presentes no estado. Cada genótipo é capaz de apresentar características distintas de interação com o organismo hospedeiro, portanto é importante monitorar quais genótipos estão mais circulantes em determinada região para fins de controle epidemiológico veterinário.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### *Comitê de Ética*

Os protocolos utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina sob protocolo número CEUA N° 3779240422.

### *Obtenção das amostras*

#### *Determinação do N amostral*

Para a determinação da prevalência do Vírus da Leucose Bovina (VLB) na população de bovinos leiteiros da raça Holandesa no estado de Santa Catarina, Brasil, foram utilizadas as seguintes fórmulas de acordo com a OPAS (1979):

$$n_0 = \frac{1,96^2[p(1 - p)]}{(d)^2}$$

Onde  $n_0$  é o número de amostras;  $p$  a prevalência esperada e da margem de erro. Admitindo-se a prevalência estimada de 50% de amostras positivas, um intervalo de confiança de 95% e uma margem de erro de 5%, foi utilizado o cálculo para população infinita obtendo-se o valor de 400 animais. Para uma melhor representatividade, foram colhidas amostras de 447 animais.

O número total de bovinos leiteiros em Santa Catarina é de 2.970.000 cabeças, sendo que em cada uma das seis mesorregiões do estado o número de animais foi determinado a partir de dados consultados no IBGE Censo Agropecuário (<https://sidra.ibge.gov.br>). A partir dos cálculos obteve-se os valores percentuais e número de animais em cada uma das seis mesorregiões: Oeste 79% ( $n=316$ ), Vale do Itajaí 7% ( $n=28$ ), Sul 7% ( $n=28$ ), Planalto Norte 3% ( $n=12$ ), Serrana 3% ( $n=12$ ) e Grande Florianópolis 1% ( $n=4$ ).

As propriedades foram selecionadas aleatoriamente, e as informações gentilmente cedidas pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC) para o contato com os proprietários.

#### *Animais e amostragem*

As amostras foram colhidas entre setembro de 2022 e fevereiro de 2023. Foram colhidas amostras de sangue em tubos à vácuo contendo EDTA 10%, da veia jugular externa de 447 bovinos da raça Holandesa, fêmeas em lactação, acima de dois anos de idade, registradas na Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (ABCBRH), oriundas de 27

propriedades produtoras de leite acima de 100 vacas em lactação que aceitaram participar do projeto de pesquisa. As propriedades foram selecionadas aleatoriamente nas seis mesorregiões do estado de Santa Catarina, sendo Oeste: nos municípios de Tangará, Ouro, Luzerna, Água Doce, Ibicaré, Herval D'Oeste, Treze Tílias, Capinzal, Concórdia e Fraiburgo (n=316); Serrana: Campos Novos (n=45); Planalto Norte: Major Vieira e Papanduva (n=20); Grande Florianópolis: Governador Celso Ramos (n=10); Vale do Itajaí: Ituporanga e Rio do Oeste (n=28); Sul: Lauro Muller e Braço do Norte (n=28). As amostras foram congeladas a -20°C até a extração do DNA e a realização da PCR.

#### *Extração, purificação, quantificação e diluição de ácidos nucleicos*

Os ácidos nucleicos foram extraídos com o kit comercial para extração de DNA genômico ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega®), conforme instruções do fabricante. Após extração e purificação, o DNA obtido foi eluído em 100µL de água nuclease free comercial, e quantificado por espectrofotometria com Nanodrop™ (Thermo Fisher Scientific®). As amostras foram diluídas para que todas apresentassem na concentração padrão de 30ng/µL de DNA em alíquota com 20µL totais.

#### *Reação em cadeia da polimerase (PCR)*

A infecção por VLB pode ser confirmada por meio da detecção do gene *env* do provírus, que possui 440 pares de base (pb) e está localizado na posição 5029-5468 do genoma viral. A reação de PCR foi calculada por meio de fator de diluição para amostras com concentração de DNA entre 600 e 1500ng, e era composta por 1X Green GoTaq Flexi Buffer, 25mM de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>), mix de nucleotídeos (adenina, citosina, guanina e timina) 2mM cada, 8,5 pmol de primers OBLV1A (5'- CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATACA-3') e OBLV6A (5'- CCAACATATAGCACAGTCTGGGAAGGC-3') (OIE, 2018), 3µL de template de DNA e água livre de nuclease para completar o volume final da reação de 25µL, adicionada em microtubos do tipo Eppendorf de 200µL.

A amplificação foi conduzida em termociclador (Veriti 96 well Thermal Cycler - Applied Biosystems by Thermofisher®) conforme protocolo da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2018). A reação segue o seguinte perfil de temperatura: um ciclo de cinco minutos a 94°C para desnaturação, anelamento de cinco ciclos a 94°C por quarenta e cinco segundos, 60°C por sessenta segundos e 72°C por noventa segundos, extensão com trinta e cinco ciclos de 94°C por quarenta e cinco segundos, 59°C por sessenta segundos e 72°C por noventa

segundos. A última etapa da PCR foi um ciclo de 72°C por sete minutos de extensão final, seguido de holding a 4°C.

#### *Eletroforese e visualização dos resultados*

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese com 100V e 400mA por 50 minutos, em gel de agarose 1,5%. Foram utilizados 9µL de amostra marcadas com 1µL de GelRed® nucleic acid gel stain 2X (Uniscience). O marcador molecular utilizado foi 100pb DNA Ladder corado com 6X Blue/Orange Loading Dye (Promega®). O gel foi visualizado em transiluminador L-Pix EX (Loccus®).

#### *Sequenciamento genético*

Dentre as amostras positivas, 90 foram submetidas a sequenciamento genético, representando todas as propriedades de todas as mesorregiões do estado. Os produtos amplificados foram purificados, quantificados e sequenciados de acordo com o método de terminação de cadeia em dideoxynucleotídeos de Sanger (SANGER e COULSON, 1977) no analisador ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, Ca, USA) na empresa ACTGene Análises Moleculares (Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil).

#### *Filogenia*

As sequências de nucleotídeos obtidas pelo sequenciamento de Sanger foram inseridas no software Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGAX) versão 11 (MEGA11) (TAMURA et al, 2021), submetidas a comparação com sequências previamente depositadas no GenBank com o programa de Alinhamento Básico Local (BLAST - NCBI). Para construção da árvore filogenética, foram utilizadas 23 sequências de nucleotídeos, das quais 6 eram sequências de referência e 17 obtidas neste estudo. A inferência foi realizada utilizando o método de máxima verossimilhança e o modelo Tamura-Nei, com 100 bootstraps e IC de 70% no MEGA11.

### **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O VLB é o agente etiológico da Leucose Enzoótica Bovina e é responsável por causar a maioria dos linfossarcomas em bovinos. Além disso, acarreta grandes perdas econômicas à indústria pecuária; no entanto, não há tratamento, formas de prevenção, controle e erradicação

da doença eficazes. A vigilância epidemiológica por meio de diagnóstico molecular e sequenciamento genético é capaz de identificar os genótipos circulantes em regiões específicas para desenvolver políticas públicas capazes de erradicar este vírus no futuro (CORREDOR-FIGUEROA et al., 2020).

Estudos recentes revelaram a presença de VLB em tecidos mamários, pulmonares e em sangue humano, sugerindo que além de estar associado a tumores de mama, também pode iniciar outros tipos de câncer (BUEHRING et al, 2019; DELADERMINA et al., 2020; KHATAMI et al., 2020;). Apesar da forma de transmissão e patogenia não estarem totalmente esclarecidos, a presença de DNA viral em leite fresco e carne crua já foi identificado (OLAYA-GALÁN et al., 2017), e aparentemente leucócitos infectados podem atuar como agentes para disseminação do vírus em diversos tipos de tecido (ROBINSON et al., 2016).

Este estudo apresenta dados epidemiológicos referentes à prevalência do VLB em bovinos leiteiros em Santa Catarina e, até o momento, é o primeiro estudo a utilizar sequenciamento de Sanger para detectar os genótipos circulantes no estado. A partir dos resultados obtidos, conseguimos inferir a prevalência de 29% (130/447) de animais positivos entre as 447 amostras totais, divididas de tal maneira a representar a população das seis mesorregiões do estado.

A maior prevalência de VLB pode ser encontrada na região da Grande Florianópolis, onde 10 amostras foram coletadas e, destas, seis foram positivas. Por outro lado, as outras regiões apresentaram os seguintes índices de positividade: a região Sul apresentou prevalência de 46%; Vale do Itajaí 35%; Planalto Norte de 30%; Oeste 28%. A menor prevalência foi observada na região Serrana, com 15% (Tabela 2). Entre as propriedades participantes, cinco encontravam-se livres de VLB, e todas estavam localizadas na região Oeste. Tais propriedades contam com sistemas de produção intensivo e semi-intensivo altamente tecnificados, manejo sanitário adequado e oferta de colostro em pó para bezerros. Diferentemente das demais regiões, onde o sistema de criação era semi-intensivo.

Considerando que as regiões da Grande Florianópolis, Sul e Vale do Itajaí possuem a menor população total de bovinos leiteiros, é possível notar a alta prevalência de animais positivos quando comparadas às regiões mais populosas.

Rodakiewicz et al. (2018), no estudo epidemiológico mais recente que infere a prevalência de VLB em Santa Catarina, utilizaram diagnóstico molecular e sorológico em diferentes raças de bovinos leiteiros, e determinaram que a região com maior prevalência era a Serra.

Na América do Sul é possível observar alta prevalência de VLB. Países vizinhos, como Uruguai, Paraguai, Peru, Bolívia e Venezuela, apresentaram taxas de infecção semelhantes, entre 19% e 55%. A Argentina é o país latino-americano que possui a maior prevalência de VLB, chegando a 90,9% (POLAT et al., 2016). No Brasil, a prevalência do VLB é altamente variável entre estados, podendo chegar a 60% (CAMARGOS et al., 2007). Na Paraíba, utilizando diagnóstico sorológico a prevalência foi de 23,4% (RAMALHOS et al., 2021), e no Maranhão de 9,09% com diagnóstico molecular (PEREIRA et al., 2023) em rebanhos de bovinos leiteiros. Na região sudeste do Brasil, D'Angelino et al. (2013) reportaram 4.8% de prevalência em bovinos que apresentavam sinais neurológicos associados ao BLV.

O genoma do BLV é compreende aproximadamente 8714 nucleotídeos, e consiste em quatro genes importantes que codificam proteínas estruturais, proteínas regulatórias e enzimas: os genes env, pro, pol e gag (OHNUKI et al., 2021). O gene env codifica as proteínas do envelope viral, um complexo composto por subunidades de glicoproteínas de superfície que estão ancoradas ao envelope por ligações dissulfeto com as subunidades de glicoproteínas transmembrana. A glicoproteína 51 (gp51) do envelope viral é o alvo de muitos testes diagnósticos e sequenciamento genético, devido ao seu caráter imunogênico e a presença dos epítomos conformacionais F, G e H que são responsáveis pelo reconhecimento de anticorpos monoclonais específicos (ZHAO et al., 2007),

O VLB possui variação genética menor quando comparada a outros retrovírus. Estudos filogenéticos demonstram que a variabilidade genética viral é muito baixa em bovinos naturalmente infectados de diferentes regiões geográficas. Geralmente, tais mutações são observadas ao comparar sequências de nucleotídeos de campo com as sequências de referência FLK/BLV (PLUTA et al., 2018). Cada genótipo do VLB é capaz de codificar substituições específicas de aminoácidos em regiões estruturais e não-estruturais do genoma viral. Dessa forma, podem ser classificados em 10 genótipos distintos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. No Brasil, embora existam poucos estudos filogenéticos, a partir dos resultados disponíveis, é possível afirmar que circulam predominantemente os genótipos 1, 2, 5, 6 e 7 (GREGORY et al., 2017).

No presente estudo a análise filogenética foi conduzida com o método de máxima verossimilhança no software MEGA11 utilizando-se as sequências obtidas neste estudo por meio de amplificação e sequenciamento genético da gp51 do VLB, e sequências selecionadas previamente depositadas no GenBank (EF600696, AP019597, LC080663, AF399704, LC07559, AY185360) dos Genótipos 1, 2, e 6 (Figura 5). O Genótipo 1 (G1) do VLB pode ser encontrado em todas as mesorregiões; e foi o único encontrado no Sul e Planalto Norte. As regiões Oeste e Vale do Itajaí estão associados aos Genótipos 6 (G6) e 7 (G7). O G7 foi o

segundo mais prevalente, presente nas regiões Oeste, Grande Florianópolis e Serrana (Figura 6).

A alta prevalência do G1 era esperada neste estudo, uma vez que este genótipo está presente em todos os continentes e é amplamente distribuído na América Latina. O G6 é originário da América Latina e, no Brasil, é encontrado principalmente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste. O comércio interestadual e internacional de animais é a principal forma de transmissão do VLB e, dessa maneira, variantes do G6 já foram isoladas na Ásia (SULTANOV et al., 2020; MOE et al., 2020; GAUTAM et al., 2018), ao passo que representantes do G7 podem ser encontrados mundialmente, em regiões dispersas (POLAT et al., 2017).

A inferência da prevalência de patógenos e suas variantes em determinada região e populações fornece dados importantes no que compete ao controle e prevenção de agentes nocivos à saúde animal e humana. A Leucose Enzoótica Bovina é de notificação obrigatória, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA); no entanto, não há programas e políticas públicas que visam a erradicação do Vírus da Leucose Bovina.

#### 4.4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados encontrados no presente estudo, foi verificado que a prevalência de animais positivos para o VLB foi de 29% no estado de Santa Catarina, utilizando-se PCR, e as variantes identificadas através de sequenciamento genético e filogenia estão classificadas nos genótipos 1, 6 e 7. Segundo nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho de genotipagem do VLB realizado por meio de sequenciamento de Sanger em bovinos leiteiros no estado de Santa Catarina. Esperamos que este trabalho auxilie no monitoramento do VLB em bovinos no estado, e que pesquisas epidemiológicas continuem sendo realizadas para que a produção de agentes imunogênicos e erradicação deste vírus torne-se realidade.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDA, Y. et al. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 328, p. 1-11., 2013.
- BENITEZ, O.J. et al. Breeding bulls as a potential source of bovine leukemia virus transmission in beef herds. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 254, n. 11, p. 1-9, 2019.

- BUEHRING, G.C. et al. Bovine leukemia virus discovered in human blood. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 297, p. 1-10, 2019.
- CAMARGOS, M.F. et al. Molecular characterization of the env gene from Brazilian field isolates of bovine leukemia virus. **Virus Genes**, v. 34, pg. 343-350, 2007.
- CORREDOR-FIGUEROA, A.P. et al. Prevalence and molecular epidemiology of bovine leukemia virus in Colombian cattle. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 80, n. 104171, p. 1-8, 2020.
- D'ANGELINO, R.H.R. et al. Detection of bovine leukemia virus in brains of cattle with a neurological syndrome: pathological and molecular studies. **BioMed Research International**, n. 425646, p. 1-6, 2013.
- GAUTAM, S. et al. Molecular characterization of bovine leukemia virus (BLV) strains reveals existence of Genotype 6 in cattle in India with evidence of a new subgenotype. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 6, p. 1968-1978, 2018.
- GREGORY, L. et al. Bovine leukaemia virus genotypes 5 and 6 are circulating in cattle from the state of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 1790–1797, 2017
- JOHNSON, W. E. **Origins and evolutionary consequences of ancient endogenous retroviruses**. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, p. 355-370, 2019.
- KOHARA, J. et al. Experimental transmission of Bovine Leukemia Virus in cattle via rectal palpation. **Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 1, p. 25-30, 2006.
- MEKATA, H. et al. Horizontal transmission and phylogenetic analysis of bovine leukemia virus in two districts of Miyazaki, Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 9, p. 1115-1120, 2015.
- MOE, K. K. et al. New evidence of bovine leukemia virus circulating in Myanmar cattle through epidemiological and molecular characterization. **PlosOne**, v. 15, n. 2, p. 1-20, 2020.
- MORATORIO, G. et al. Phylogenetic analysis of bovine leukemia viruses isolated in Sotuh America reveals diversification in seven distinct genotypes. **Archives in Virology**, v. 155, p. 481-489, 2010.
- OPAS (Organización Panamericana de la Salud) (1979). **Biostatistics: procedures for prevalence studies by researchers**. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud.
- POLAT, M. et al. A new genotype of bovine leukemia virus in South America identified by NGS-based whole genome sequencing and molecular evolutionary genetic analysis. **Retrovirology**, v. 13, n. 1, p. 1-23., 2016.
- POLAT, M.; TAKESHIMA, S. N.; AIDA, Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. **Virology Journal**, v. 14, n. 209, p. 1-7, 2017.
- RAMALHO, G. C. et al. High herd-level seroprevalence and associated factors for bovine leukemia virus in the semi-arid Paraíba state, Northeast Region of Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 190, n. 105324, p. 1-7, 2021.

ROBINSON, L.A. et al. Molecular evidence of viral DNA in non-small cell lung cancer and non-neoplastic lung. **British Journal of Cancer**, v. 115, p. 497-505; 2016.

RODAKIEWICZ, S. M. et al. Heterogeneity determination of bovine leukemia virus genome in Santa Catarina state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1-7, 2018.

RUIZ, V. et al. Bovine Leukemia virus infection in neonatal calves. risk factors and control measures. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, n. 267, p. 1-7, 2018.

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SULTANOV, A. et al. Molecular characterization of bovine leukemia virus with the evidence of a new genotype circulating in cattle from Kazakhstan. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 2-21, 2022.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022–3027, 2021

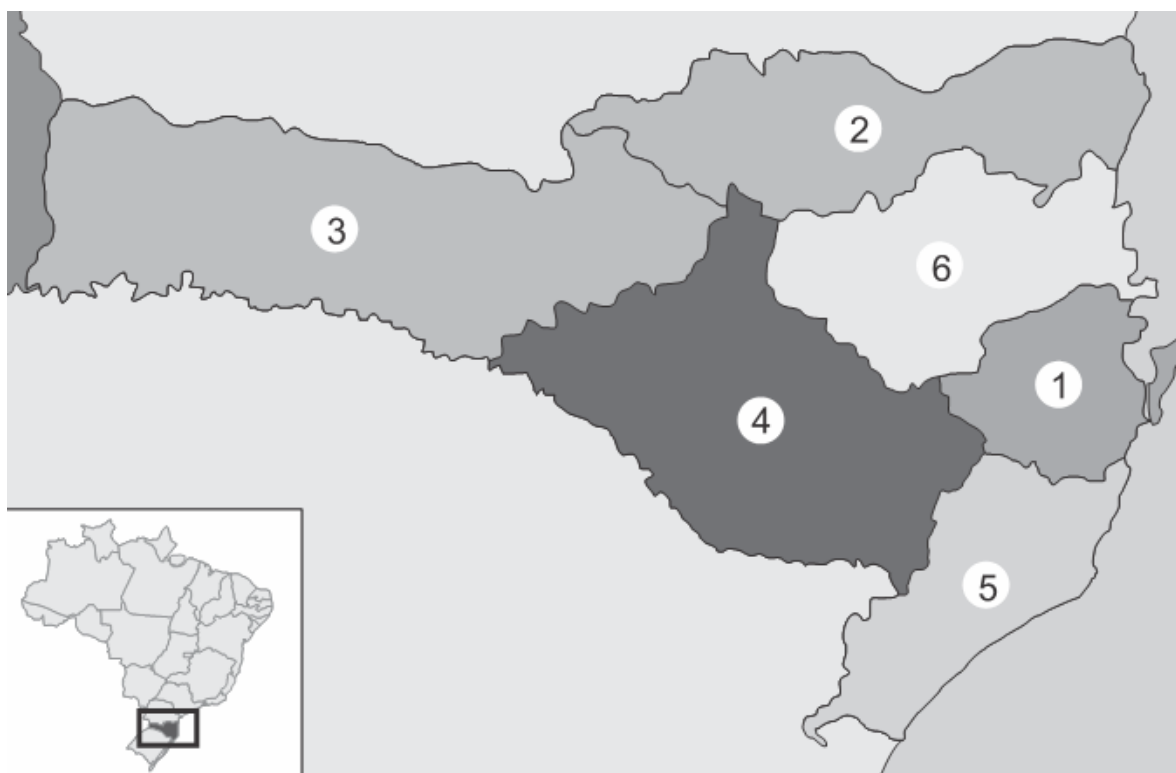
ZHAO, X. et al. Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: possible effects of selection and escape. **Virology**, v. 366, n. 1, p. 150-165, 2007.

#### 4.6 ANEXOS

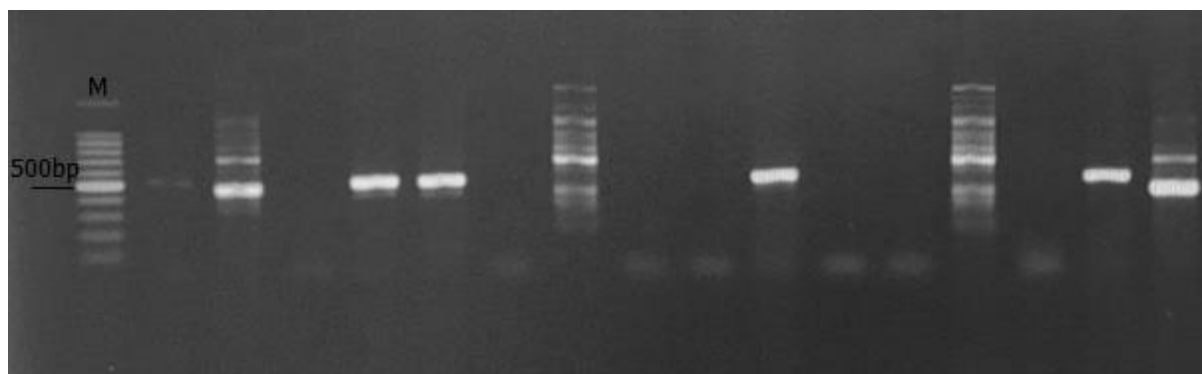
**Tabela 2.** Prevalência do Vírus da Leucose Bovina (VLB) por meio de diagnóstico por PCR em bovinos leiteiros da raça Holandesa no estado de Santa Catarina, Brasil, de acordo com cada mesorregião. Demonstra o número total de amostras coletadas, os positivos e a relação ao número total de amostras (n=447).

REGIÃO	Total	Positivos	% de positivos por Região	% de positivos relativo ao N total
Grande Florianópolis	10	6	60%	1,34%
Sul	28	13	46%	2,9%
Vale do Itajaí	28	10	35%	2,23%
Planalto Norte	20	6	30%	1,34%
Oeste	316	88	27%	19,68%
Serrana	45	7	15%	1,56%

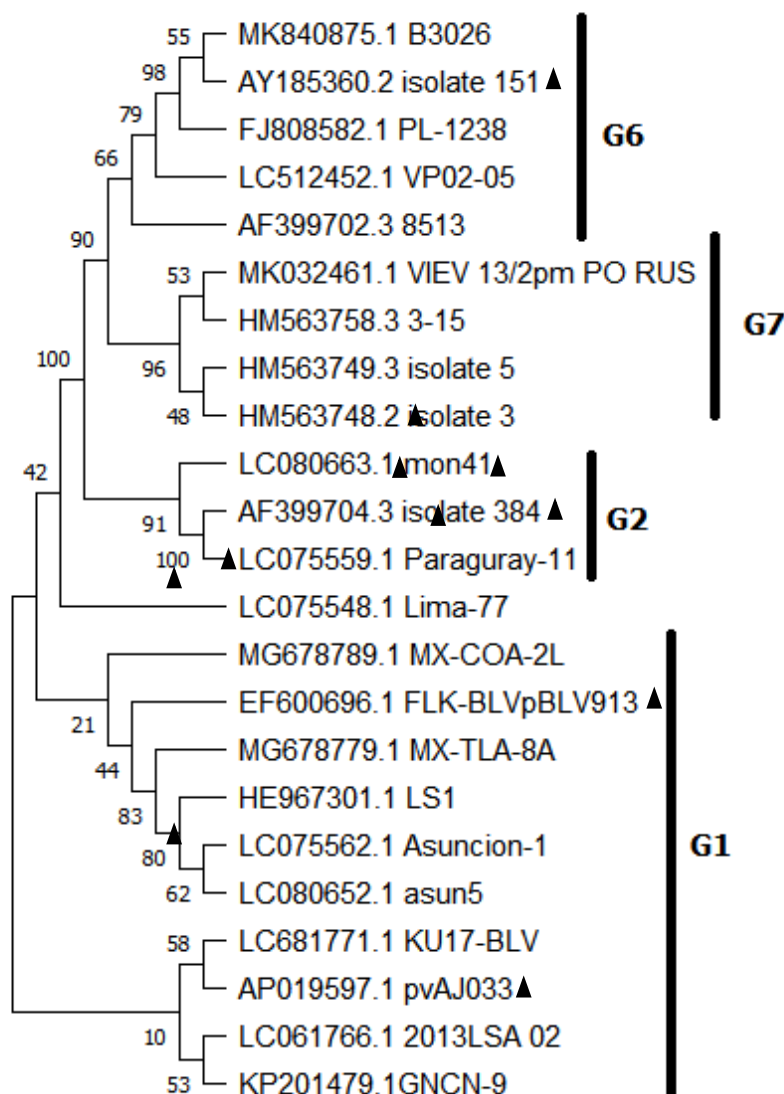
O percentual de amostras positivas por região correlacionados foi calculado com a fórmula epidemiológica para a taxa de prevalência:  $N(\text{positivos})/N(\text{total}) \times 100$ .



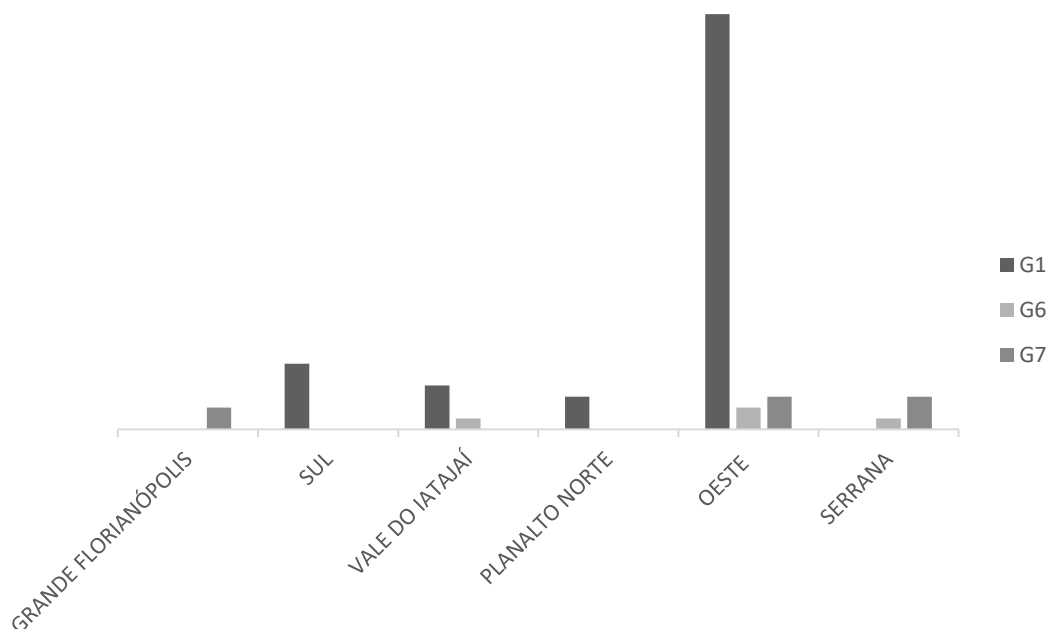
**Figura 3.** Mapa representando o estado de Santa Catarina, Brasil, e suas mesorregiões: Grande Florianópolis (1), Planalto Norte (2), Oeste (3), Serrana (4), Sul (5) e Vale do Itajaí (6).



**Figura 4.** Resultados de diagnóstico por PCR de VLB, visualizados em transiluminador. O marcador molecular está indicado pela letra M, e os demais são amostras deste estudo.



**Figura 5.** A história evolutiva foi inferida utilizando o método de máxima verossimilhança e o modelo Tamura-Nei. A árvore com o ramo com maior verossimilhança (-15069.78) está demonstrada. A porcentagem de árvores nas quais a taxa associada a clusters está demonstrada próxima aos ramos. A árvore inicial para a busca heurística foi obtida automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matrix de distâncias estimadas utilizando o modelo Tamura-Nei, e então selecionando a topologia com valor de verossimilhança superior. Esta análise envolveu 23 sequências de nucleotídeos, com um total de 8720 posições nos dados finais. As análises foram conduzidas no MEGA11.



**Figura 6.** Histograma demonstrando a prevalência dos genótipos 1, 6 e 7 por mesorregião no estado de Santa Catarina, baseado nas sequências de nucleotídeos obtidas neste estudo.

#### Apoio:

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico – Chamada CNPq/MCTI/FNDCT N° 18/2021 – Faixa A – Grupos Emergentes – 404569/2021-8 – Termo de outorga: 404569/2021-8, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Brasil – Código de Finança 001, a Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC) pelo fornecimento dos dados referentes as propriedades leiteiras do Estado de Santa Catarina por meio do TERMO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA N° 7921, e ao Programa de Bolsas de Monitoria de Pós-Graduação (PROMOP) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) pelo apoio para desenvolver este estudo.



## Assinaturas do documento



Código para verificação: **45X5XX8P**

Este documento foi assinado digitalmente pelos seguintes signatários nas datas indicadas:



**JOANDES HENRIQUE FONTEQUE** (CPF: 879.XXX.419-XX) em 14/08/2023 às 18:05:32

Emitido por: "SGP-e", emitido em 30/03/2018 - 12:36:59 e válido até 30/03/2118 - 12:36:59.

(Assinatura do sistema)

Para verificar a autenticidade desta cópia, acesse o link <https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo/conferencia-documento/VURFU0NfMTlwMjJfMDAwMzQ5MDhfMzQ5MzdfMjAyM180NVg1WFG4UA==> ou o site <https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo> e informe o processo **UDESC 00034908/2023** e o código **45X5XX8P** ou aponte a câmera para o QR Code presente nesta página para realizar a conferência.