

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

GRAZIELA VIEIRA FONTEQUE

**PREVALÊNCIA DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA E ASSOCIAÇÃO DOS
ALELOS BoLA-DRB3 NA RAÇA CRIOLA LAGEANA**

LAGES

2023

GRAZIELA VIEIRA FONTEQUE

**PREVALÊNCIA DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA E ASSOCIAÇÃO DOS
ALELOS BoLA-DRB3 NA RAÇA CRIOLA LAGEANA**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciência Animal,
do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do
Estado de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do grau
de Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Claudio Milette.

Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Ivane Ganz Vogel

LAGES

2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Universitária Udesc,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Fonteque, Graziela Vieira
Prevalência da leucose enzoótica bovina e associação dos alelos
BoLA-DRB3 na raça Crioula Lageana / Graziela Vieira Fonteque. --
2023.
74 p.

Orientador: Luiz Cláudio Milette
Coorientadora: Carla Ivane Ganz Vogel
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal, Lages, 2023.

1. Genotipagem. 2. Resistência. 3. Raça Crioula. I. Milette, Luiz
Cláudio . II. Vogel, Carla Ivane Ganz. III. Universidade do Estado
de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

GRAZIELA VIEIRA FONTEQUE

**PREVALÊNCIA DA LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA E ASSOCIAÇÃO DOS
ALELOS BoLA-DRB3 NA RAÇA CRIOLA LAGEANA**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina.

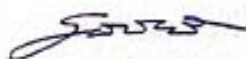
BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
gov.br LUIZ CLAUDIO MILETTI
Data: 14/12/2023 08:58:30-0300
Verifique em <https://validar.jb.gov.br>

Prof. Dr. Luiz Claudio Miletti

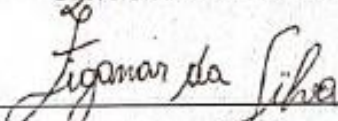
UDESC

Membros:



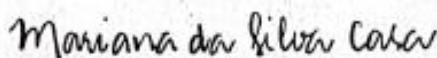
Prof. Dr. Guillermo Giovambattista

Universidad de La Plata



Dr. Zigomar da Silva

McGill University



Dra. Mariana da Silva Casa

Autônoma

Documento assinado digitalmente
gov.br ANDRÉ THALER NETO
Data: 14/12/2023 08:40:33-0300
Verifique em <https://validar.jb.gov.br>

Prof. Dr. André Thaler Neto

UDESC

Lages, 08 de dezembro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me capacitar, dar-me forças nas batalhas, enviar pessoas para me ajudar e livrar-me das emboscadas. Creio que tudo tem um propósito e acontece ao seu tempo. Ajuda-me a aceitar e compreender.

Ao meu marido Joandes Henrique Fontequê, amor da minha vida, pelo seu apoio incondicional, incentivo para retornar os estudos e fazer o doutorado (10 anos após o mestrado, com dois filhos e trabalhando). Obrigada por aceitar enfrentar esse desafio comigo. Se não tivesse você como companheiro eu não teria conseguido. Gratidão por sua paciência, compreensão e amor. Por toda dedicação e auxílio desde as tarefas mais simples de casa e os cuidados com os meninos, possibilitando que eu me dedicasse aos estudos e desenvolvesse este trabalho de pesquisa. Obrigada por confiar e acreditar na minha capacidade, apoiar-me e não me deixar desistir. Eu te amo, sou eternamente grata à Deus por ter me enviado você, o melhor marido e pai que conheço.

Aos meus filhos Piero Paolo Vieira Fontequê e Valentino Vincenzo Vieira Fontequê por todo amor, compreensão e abdicção. Por tantas vezes que não pude estar com vocês, brincar, passear aos finais de semana. Pelos dias que tiveram que acordar cedo e ir correndo pra casa da tia Camila Pereira, tia Lilian Spieker, tia Laryssa Lopes, tia Nataly Nunes, as tias da Recrear e Alegria da Criança. Foram tantos dias de correria, almoço apressado, improvisado, para que a mãe conseguisse estudar e trabalhar. Saibam que essa foi a parte mais difícil da jornada, abrir mão de estar mais tempo com vocês e com o papai. Que meu amor por vocês seja recompensador.

A minha vó Vilma Carniel Maziero, aos meus pais Igner T. M. Vieira e Adair Vieira, meus irmãos: Flávia Vieira Tacca, Edilson José Vieira e Mateus André Vieira, pelo apoio durante toda a caminhada, desde o início lá em Maximiliano de Almeida, Erechim, Passo Fundo até aqui. A trajetória é longa, tortuosa e cheia de pedras e espinhos pelo caminho, mas quando temos alguém para nos estender a mão fica mais fácil de superar os desafios. Contem comigo, assim como sei que posso contar com vocês.

Aos meus Dindos: Vera Maria Villamil Martins e Edison Martins, nossa família Lageana. Sou abençoada por ter pessoas como vocês em minha vida. Profa. Vera, desde a primeira fase da faculdade, de professora se tornou minha amiga, confidente e conselheira. O verdadeiro significado de madrinha, nossa mãezinha Lageana. A melhor professora que já tive e a melhor madrinha que poderia ter.

As minhas amigas, colegas e companheiras para todas as horas Dra. Mariana da Silva Casa e Dra. Marcia Liliane Rippel da Silveira, sou grata à Deus por sua amizade. Obrigada por compartilharem conhecimento e seu tempo comigo. Vocês são as melhores colegas que eu poderia ter (no trabalho e nos estudos), sem seu apoio eu já teria desistido, ou nem mesmo começado! Mari: sinto saudades das aulas, trabalhos, pesquisa, das PCRs em tempos de pandemia e até mesmo das provas que fizemos juntas nas disciplinas. Marcinha: a amiga que tem respostas para todas as áreas, te admiro muito, minha inspiração. Obrigada por despender de seu tempo para me ouvir por horas, por me ajudar a retomar a caminhada, não foi fácil, mas sem sua ajuda seria impossível!

Aos meus amigos Michele Schade e Jackson Schade, Eleani Bettanin Conte e Gilmar Conte, Lilian Spieker e Rafael de Lima, Cirlei Silva Cunha e Jorge Henrique Oliveira Cunha, e Jocelene Marian vocês são amigos queridos em quem podemos confiar e contar, obrigada pelo apoio emocional e no cuidado com os meninos. Uma boa conversa e umas cuias de chimarrão muitas vezes valem que uma consulta psiquiátrica.

Minha amiga Fátima Arruda Melim, minha colega de academia e inglês, obrigada pelo apoio, por me chamar a reagir e não me deixar abater, desanimar. Você é muito especial em minha vida, daquelas pessoas especiais que Deus coloca em nosso caminho.

Ao Pastor Marcos Henrique Fries, a galera da Juventude Evangélica Luterana (JEL) e as amigas da Ordem Auxiliadora de Senhoras Evangélicas (OASE), em especial a Ariane Richter Taffarel e a Dona Marleni Huber por me ouvirem, orarem e aconselharem tantas vezes. Graças dou por vocês em minha vida.

À psicóloga do CAV-UDESC, Estela Maris Bernardelli por desempenhar brilhantemente o seu trabalho, auxiliando-me a vencer meus monstros, não desistir da luta. Você é ótima.

Ao meu orientador, professor Dr. Luiz Claudio Miletti, pela oportunidade, por aceitar me orientar, compreender e ser paciente neste longo período de afastamento.

À professora Dra. Carla Ivane Ganz Vogel pela co-orientação e auxílio na concepção deste trabalho.

Aos professores que estiveram sempre doando um pouco de seu tempo para que nosso trabalho fosse melhor, tirando dúvidas e ajudando no que fosse preciso, agradeço especialmente ao professor Dr. Ubirajara Maciel da Costa pelos ensinamentos, por ceder o laboratório e equipamentos do Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA).

À Dra. Julieta Volpato pelo auxílio nas análises citológicas, e à toda equipe do Laboratório de Patologia Clínica do CAV – UDESC envolvida das análises hematológicas.

Agradeço a Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Crioula Lageana (ABCCL) e aos criadores, que gentilmente cederam seus animais e a quem presto meu reconhecimento pelo trabalho que realizam para o melhoramento e conservação da raça.

Agradeço à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, de Brasília – DF, em especial à Dra. Maria do Socorro Maués Albuquerque e ao Dr. Alexandre Floriani Ramos, que gentilmente cederam materiais e reagentes para fomentar este trabalho.

À Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), ao Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento em Medicina Veterinária (PDVET) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

E à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) por fomentar este trabalho de pesquisa (TERM OF GRANT SPONTANEOUS DEMAND – PESQUISA 2015; No.: 2015TR1543; PROCESSO No.: FAPESC1827/2015).

Ainda que andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.

Salmo 23:4

RESUMO

FONTEQUE, G.V. 2023, 74p. **Prevalência da leucose enzoótica bovina e associação dos alelos BoLA-DRB3 na raça Crioula Lageana.** Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2023.

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma doença infecciosa e cosmopolita causada pelo vírus da leucose enzoótica bovina (BLV). O BLV é um retrovírus que infecta naturalmente bovinos, com tropismo por linfócitos B. Na maioria dos casos, a LEB é subclínica e, menos frequentemente, os animais infectados apresentam linfocitose persistente e linfossarcoma, levando à deficiência imunológica, causando perdas econômicas relacionadas aos custos do tratamento e queda na produção ou descarte de animais. O vírus foi identificado em tecido mamário oncológico em humanos, possibilitando a correlação entre o consumo de carne e/ou leite com a maior frequência de desenvolvimento da doença. A raça Crioula Lageana é resultado da seleção natural, e apresenta alta variabilidade genética e alelos de resistência associados a patógenos e determinação de resistência às infecções. A preservação da raça e sua utilização em programas de conservação e melhoramento genético contribuem com a manutenção da saúde única, ao fornecer alimento de qualidade, reduzindo risco de transmissão de doenças, gastos com tratamento e poluição ambiental pelo uso de medicamentos. O objetivo do trabalho foi determinar a prevalência da LEB em bovinos da raça Crioula Lageana e a associação dos alelos do gene BoLA-DRB3 à resistência ou susceptibilidade à infecção natural pelo BLV. Amostras de 308 bovinos de seis propriedades do Planalto Serrano de Santa Catarina, foram submetidas ao teste de ELISA e PCR. Em nosso conhecimento esse é o primeiro trabalho de prevalência de leucose em bovinos da raça Crioula Lageana. A prevalência de LEB foi de 6,82% (21/308) para o teste de ELISA e 36,69% (113/308) para PCR-BLV. A leucocitose com linfocitose esteve presente em 11% (18/113) dos animais positivos na PCR. Nenhum animal apresentou a forma clínica de linfossarcoma. Observou-se alta variabilidade para o gene BoLA-DRB3 por meio do sequenciamento de Sanger. O alelo *DRB3*1201* do gene BoLA-DRB3 está associado à resistência à infecção pelo BLV. Concluímos que o BVL está presente na raça Crioula Lageana, e a seleção de animais contendo o alelo de resistência pode ser utilizada no desenvolvimento de estratégias de prevenção e controle para evitar a disseminação do vírus.

Palavras-chave: Genotipagem; Resistência; Raça Crioula.

ABSTRACT

FONTEQUE, G.V. 2023, 75p. **Prevalence of enzootic bovine leukosis and association of BoLA-DRB3 alleles in the Crioula Lageana breed.** Tesis (PhD in Animal Science) – University of the State of Santa Catarina. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2023.

Enzootic bovine leukosis (EBL) is an infectious and cosmopolitan disease caused by the bovine enzootic leukosis virus (BLV). BLV is a retrovirus that naturally infects cattle, with tropism for B lymphocytes. In most cases, EBL is subclinical and, less frequently, infected animals present persistent lymphocytosis and lymphosarcoma, leading to immunological deficiency, causing economic losses related to costs treatment and drop in production or disposal of animals. The virus was identified in oncological breast tissue in humans, making it possible to correlate the consumption of meat and/or milk with a greater frequency of development of the disease. The Crioula Lageana breed is the result of natural selection, and presents high genetic variability and resistance alleles associated with pathogens and determination of resistance to infections. The preservation of the breed and its use in conservation and genetic improvement programs contribute to the maintenance of unique health, by providing quality food, reducing the risk of disease transmission, treatment costs and environmental pollution due to the use of medicines. The objective of the work was to determine the prevalence of EBL in cattle of the Crioula Lageana breed and the association of alleles of the BoLA-DRB3 gene with resistance or susceptibility to natural infection by BLV. Samples from 308 cattle from six properties in the Serrano Plateau of Santa Catarina were subjected to ELISA and PCR testing. To our knowledge, this is the first study on the prevalence of leukosis in Crioula Lageana cattle. The prevalence of EBL was 6.82% (21/308) for the ELISA test and 36.69% (113/308) for PCR-BLV. Leukocytosis with lymphocytosis was present in 11% (18/113) of PCR-positive animals. No animal presented the clinical form of lymphosarcoma. High variability was observed for the BoLA-DRB3 gene through Sanger sequencing. The DRB3*1201 allele of the BoLA-DRB3 gene is associated with resistance to enzootic bovine leukosis virus infection. We conclude that BVL is present in the Crioula Lageana breed, and the selection of animals containing the resistance allele can be used in the development of prevention and control strategies to avoid the spread of the virus.

Keywords: Genotyping; Resistance; Local breed.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Surtos de leucose enzootica bovina notificados em todo o mundo em 2021 segundo OIE Platform Wahis.....	20
Figura 2 - Médias de soroprevalências calculadas por região de acordo com vários autores.....	21
Figura 3 - Médias de soroprevalências de leucose enzootica bovina calculadas por região de acordo com vários autores.....	22
Figura 4 – Notificações de LEB em todo o mundo em 2021.....	37
Figura 5 – Prevalência (%) de BLV em bovinos da raça Crioula Lageana em seis propriedades do Planalto Serrano de SC, Brasil.....	38
Figura 6 - Prevalência (%) de BLV em bovinos da raça Crioula Lageana em cinco classes (touro, vaca, novilha, bezerra e bezerro), de acordo com sexo e faixa etária.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos de prevalência para LEB de acordo com o método diagnóstico e variações epidemiológicas em cada país.....	20
Tabela 2 - Soroprevalência de LEB através do método diagnóstico de ELISA e variações epidemiológicas em cada país.....	37
Tabela 3 - Prevalência de BLV na raça Crioula Lageana em 6 propriedades do Planalto Serrano de SC.....	40
Tabela 4 – Prevalência de LEB nas diferentes classes e associações através do teste de Qui-Quadrado (χ^2).....	41
Tabela 5 - Frequências observadas e esperadas para os alelos BoLA-DRB3 e associação com LEB em 208 animais da raça Crioula Lageana.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCCL	Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Crioula Lageana
AGID	Agar gel immunodiffusion
BLV	vírus da leucose enzoótica bovina
BoLA	<i>Bovine Leukocyte Antigen</i>
BTA23	<i>bovine chromosome 23</i>
<i>Cahi</i>	<i>Capra hircus Major histocompatibility Complex</i>
DNA	Acido desoxirribonucleico/ <i>Deoxirribonucelic Acid</i>
EBL	<i>Enzootic Bovine Leukosis</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<i>Env</i>	<i>Envelop</i>
FAO	Food and Agriculture Organization
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
LEB	Leucose Enzoótica Bovina
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
mAb	Anticorpo monoclonal/ <i>monoclonal antibody</i>
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal/ <i>Major histocompatibility Complex</i>
<i>Ovar</i>	<i>Ovis aries Major histocompatibility Complex</i>
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pol	Polimerase
Pro	Protease
χ^2	<i>Q-squared</i>

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	16
2.1.	OBJETIVO GERAL	16
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	HIPÓTESE	17
4	REVISÃO DE LITERATURA	18
4.1.	A RAÇA CRIOLA LAGENA	18
4.2.	LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA	18
4.2.1	<i>Etiologia</i>	19
4.2.2.	<i>Epidemiologia</i>	19
4.2.3	<i>Importância econômica</i>	22
4.2.4	<i>Importância para a Saúde Pública</i>	22
4.2.5	<i>Patogenia</i>	23
4.2.6	<i>Sinais Clínicos</i>	23
4.2.7	<i>Diagnóstico</i>	24
4.2.8	<i>Tratamento, Controle e Prevenção</i>	24
4.3.	COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL	25
4.3.1.	<i>Estrutura tridimensional do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)</i>	25
4.3.2.	<i>Organização Genômica da Região MHC</i>	26
4.3.3.	<i>Complexo de Histocompatibilidade Principal – MHC Classe IIa, Sub-região DR</i>	27
4.3.4.	<i>Polimorfismo Alélico do Loci BoLA-DRB3</i>	27
4.3.5.	<i>Locus BoLA-DRB3 associados a Resistência e Susceptibilidade à LEB</i>	28
4.3.6.	<i>Resistência X Susceptibilidade à outras doenças</i>	29
4.4.	Considerações Finais	30
5.	ARTIGO 1	31
6.	ARTIGO 2	49
	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A produção animal mundial precisa atender às necessidades e desafios na gestão de recursos genéticos animais, além de suprir as demandas de produção mitigando a fome e a pobreza, garantir segurança alimentar, minimizando a ocorrência de doenças, visando a manutenção da saúde única, mantendo a biodiversidade e a integridade ambiental. A gestão efetiva dos recursos genéticos e sua utilização para suprir as necessidades das gerações futuras, parte do conhecimento sobre as raças, programas de melhoramento visando a biodiversidade, desenvolvimento econômico e social.

A preservação da diversidade pode ser conseguida pela conservação dos recursos genéticos, o uso e propagação de material genético, através da reprodução e multiplicação, da utilização de raças localmente adaptadas de bovinos como a Crioula Lageana. Essas populações têm sofrido longos processos de seleção natural, adaptando-se localmente, graças as características de rusticidade e resistência às doenças, aliadas a índices produtivos satisfatórios.

No estado de Santa Catarina encontra-se o maior núcleo de conservação *in situ* dessa raça, garantindo preservação e possível fonte de recursos genéticos para o mundo. Além destes, locais de conservação *ex situ*, na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília-DF e nos estados do Paraná e Tocantins onde estão sendo realizados trabalhos de pesquisa visando manutenção e diversidade genética.

Os trabalhos de pesquisa da raça têm sido de suma importância na obtenção de resultados frente aos desafios de conservação e manutenção da variabilidade genética, recursos genéticos e saúde única. Neste sentido, o objetivo foi determinar a prevalência da leucose enzoótica bovina e a associação dos alelos BoLA-DRB3 na raça Crioula Lageana com a resistência ou susceptibilidade à infecção natural pelo BLV.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência da LEB em bovinos da raça Crioula Lageana e a associação dos alelos do gene BoLA-DRB3 à resistência ou susceptibilidade da infecção natural pelo BLV.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a soroprevalência da leucose enzoótica bovina por meio do teste de ELISA em bovinos da raça Crioula Lageana;

Determinar prevalência da leucose enzoótica bovina por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de presença do BLV em bovinos da raça Crioula Lageana;

Determinar a sequência nucleotídica dos alelos do gene BoLA-DRB3 presentes na raça Crioula Lageana;

Verificar a associação entre os alelos BoLA-DRB3 encontrados e a infecção natural pelo VLB na raça Crioula Lageana.

3 HIPÓTESE

Espera-se encontrar associação genética positiva entre animais infectados e que apresentem alelos BoLA-DRB3 associados à resistência na população da raça Crioula Lageana, demonstrando que a variabilidade existente está intimamente associada à resistência à leucose enzoótica bovina.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1. A RAÇA CRIOULA LAGEANA

A Crioula Lageana é uma raça bovina localmente adaptada do Planalto Serrano de Santa Catarina, Brasil. É o resultado da seleção natural decorrente de quase cinco séculos no ambiente de clima hostil desta região, caracterizada pelo frio intenso, escassez de alimento, presença de parasitas e microorganismos patogênicos. Após a vinda de material genético de bovinos europeus, houve miscigenação, o que fez com que a raça quase fosse extinta (Mariante and Cavalcante, 2000; Martins, 2021), constando na lista de raças em risco extinção, de acordo com a classificação da FAO (2007).

No entanto, graças aos trabalhos de pesquisa e dos criadores, fundou-se a Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Crioula Lageana (ABCCL), dos quais, por esforços conjuntos, levou ao reconhecimento oficial da Raça Crioula Lageana e sua Variedade Mocha por parte do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil em 2008. Isso alavancou os trabalhos que já vinham sendo realizados para que houvesse resgate e manutenção do material genético, possibilitando a seleção e o melhoramento genético, promovendo a conservação da raça. Isso também permitiu a ampliação do rebanho e com a aquisição de exemplares da raça por criadores da região Norte do Brasil, a distribuição nacional, pois até aquele momento a raça estava restrita a região Sul do país, com maior concentração no Planalto Serrano de Santa Catarina (Spritze *et al.*, 2003; Serrano *et al.*, 2004; Bianchini *et al.*, 2006; Egito *et al.*, 2007; Martins, 2009; Teixeira *et al.*, 2012; Cardoso *et al.*, 2013; Fino *et al.*, 2013; Martins, 2021).

Dentre os trabalhos recentemente realizados, destacam-se os de determinação de variabilidade genética, identificação da presença de alelos de resistência, associação à patógenos e determinação de resistência às infecções, comprovando a importância da sua preservação e utilização em programas de conservação e melhoramento genético (Casa *et al.*, 2023; Fiorin *et al.*, 2023).

4.2. LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA

A LEB também conhecida como leucemia bovina é uma doença infectocontagiosa, cosmopolita, que afeta bovinos, bubalinos e cervídeos. Apresenta-se na forma subclínica na maioria dos casos, podendo evoluir para linfocitose persistente e linfossarcoma, com menor frequência. A transmissão pode se dar de maneira horizontal, pela exposição a fluidos

contaminados com linfócitos infectados (sangue, leite, sêmen e saliva). Ou vertical, ao nascimento, pelo consumo de colostro ou leite. É mais comum em rebanhos leiteiros onde determina grandes perdas econômicas relacionadas à queda de produção, custos com tratamento, limitações na reprodução e comercialização, até a morte dos animais (Gillet *et al.*, 2007; Ramalho *et al.*, 2020; Woah, 2021).

4.2.1 Etiologia

Causada pelo BLV, um membro da família *Retroviridae*, é capaz de produzir um provírus DNA após a integração com o genoma do hospedeiro, principalmente dos linfócitos B e T de bovinos (Meirelles *et al.*, 2009).

A organização genômica do BVL, como nos demais retrovírus, dispostos de 5' para 3' entre as repetições terminais longas (LTR, *long terminal repeats*) do genoma, os genes estruturais *gap* (p12, p15, p24), *pro* (protease), *pol* (transcriptase reversa e integrase), e *env* (gp51 e gp30) do capsídeo e envelope viral respectivamente, necessários para a produção de vírions infectantes; e as proteínas regulatórias codificadas pelo gene X (Tax, Rex, G4 e R3) (Gaudray *et al.*, 2002). Dentre os três principais grupos de proteínas virais que determinam a resposta imunológica no hospedeiro, a P24 é a principal proteína estrutural não glicosilada, e no grupo das glicoproteínas a GP51 é o principal antígeno, utilizada no desenvolvimento de testes de imunodifusão em gel (Resende *et al.*, 2021).

4.2.2. Epidemiologia

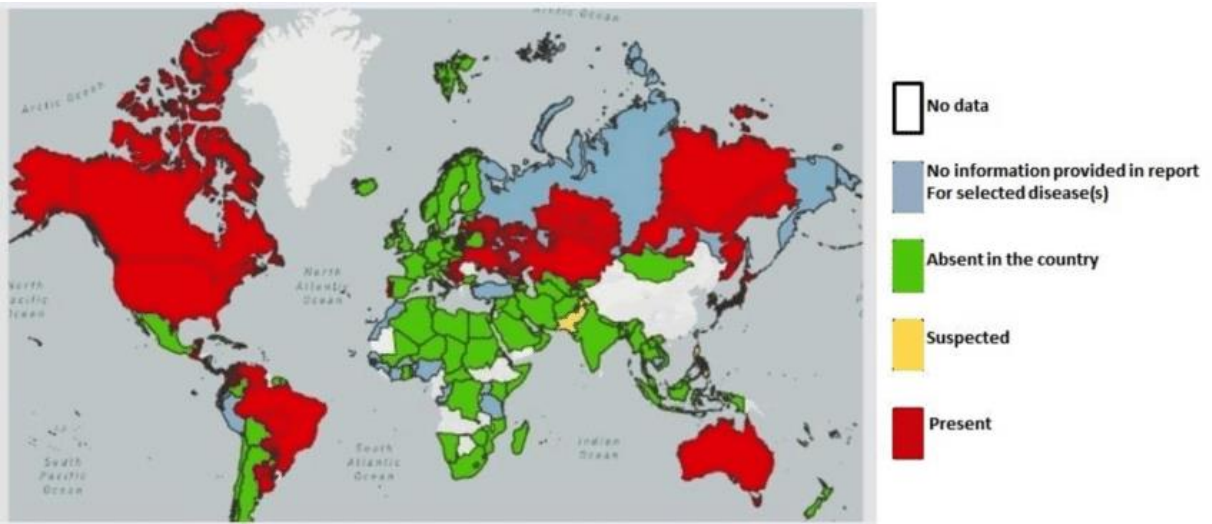
A LEB acomete, principalmente, bovinos, embora a infecção natural tenha sido descrita em bubalinos (Chaves *et al.*, 2012; Olaya-Galán *et al.*, 2022), cervídeos (Frölich *et al.*, 2006) e ovinos (Olaya-Galán *et al.*, 2022).

Relatada pela primeira vez na Alemanha em 1874, a doença disseminou-se pelo mundo através do comércio de animais vivos (Figura 1). Atualmente é endêmica em muitos países, com variações epidemiológicas de acordo com as características de cada país e rebanho (Tabela 1). A prevalência é até quatro vezes maior em bovinos leiteiros quando comparada aos bovinos de corte. Não tem predileção por raça, sexo ou idade, no entanto apresenta maior sororreatividade em fêmeas com idade superior a 48 meses (Juliano *et al.*, 2014; Ramalho *et al.*, 2020; Woah, 2021).

Em bezerros de seis até 12 meses de idade a sororreatividade pode se dar por transmissão passiva via placentária, ou por ingestão de colostro de mães positivas (Kobayashi *et al.*, 2014;

Ramalho *et al.*, 2020), caracterizando falso positivo. A monta natural pode constituir importante forma de transmissão. Em um estudo realizado com 121 touros, 45% foram soropositivos para o teste de ELISA e 7,4% apresentaram DNA proviral no sêmen (Benitez *et al.*, 2019).

Figura 1 – Surtos de leucose enzootica bovina (LEB) notificados em todo o mundo em 2021 segundo OIE Platform Wahis.



Fonte: OIE Platform Wahis

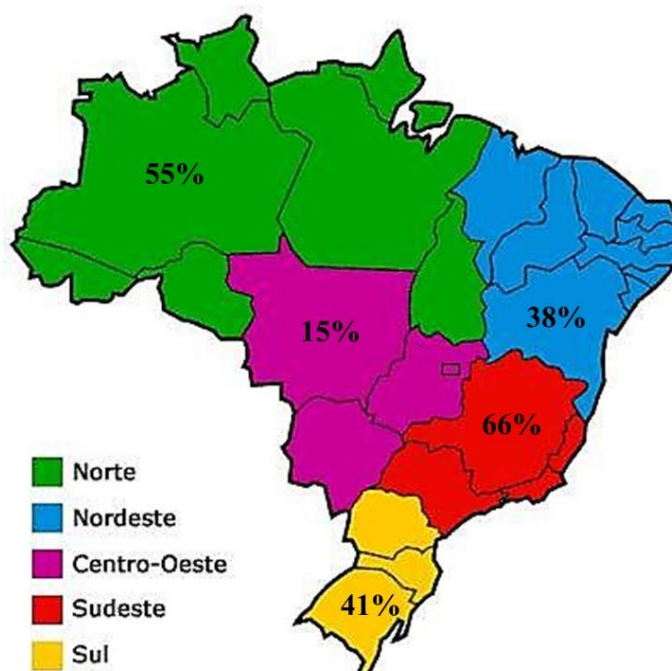
Tabela 1 – Estudos de prevalência para leucose enzoótica bovina (LEB) de acordo com o método diagnóstico e variações epidemiológicas em cada país.

Método Diagnóstico	Frequência (%)	País	Referência
AGID	24	Canadá	(Heald <i>et al.</i> , 1992)
AGID	17	Bulgária	(Sandev <i>et al.</i> , 2001)
AGID	08	Brasil	(Amoril <i>et al.</i> , 2009)
AGID	63	Brasil	(Meirelles <i>et al.</i> , 2009) A
AGID	81	Brasil	(Meirelles <i>et al.</i> , 2009) B
AGID	26	Brasil	(Meirelles <i>et al.</i> , 2009) C
ELISA	11	Peru	(Uysal <i>et al.</i> , 1998)
ELISA	15	Chile	(Grau and Monti, 2010)
ELISA	29	Japão	(Murakami <i>et al.</i> , 2011)
ELISA	82	Iran	(Morovati <i>et al.</i> , 2012)
ELISA	61	Venezuela	(Nava <i>et al.</i> , 2011)
ELISA	20	Colômbia	(Benavides Benavides <i>et al.</i> , 2013)
ELISA	02	Turquia	(Şevik <i>et al.</i> , 2015)
ELISA	07	Iraque	(Khudhair <i>et al.</i> , 2016)
ELISA	39	EUA	(Bauermann <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Modificado de Ramalho et al 2020.

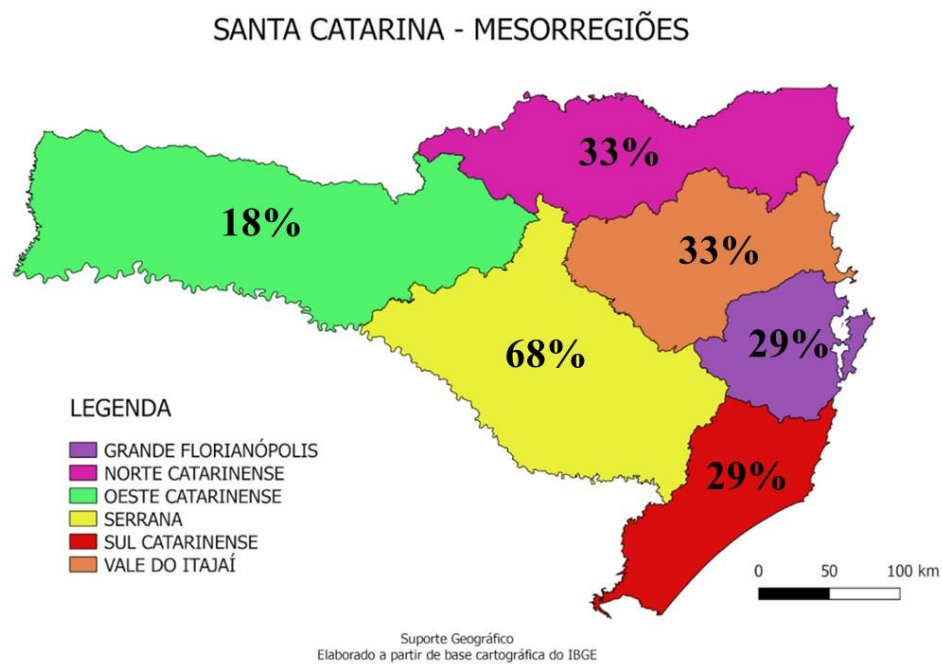
No Brasil foram desenvolvidas pesquisas sorológicas de prevalência, em bovinos de corte e leite, em todas as regiões do país (Figura 2): Região Norte: (Carneiro *et al.*, 2003) 9,2% no Amazonas; (Fernandes *et al.*, 2021) 37% em Tocantins, (Juliano *et al.*, 2014) 27,8% no estado de Tocantins; Região Nordeste: (De Matos *et al.*, 2005) 41% na Bahia; (Santos *et al.*, 2020) 53,8% no Estado do Maranhão; (Santos *et al.*, 2013) 20,7% na Microrregião Garanhuns, Pernambuco; Região Centro-Oeste: (Juliano *et al.*, 2014) 15,3% no estado de Goiás; Região Sudeste: (Megid *et al.*, 2003) 51,8% em Botucatu – SP; (Rajão *et al.*, 2014) 79,7% em Minas Gerais; Região Sul: (Júnior *et al.*, 2003) 40,7% em Londrina -PR; (Poletto *et al.*, 2004) 23,53% em Passo Fundo – RS; (De Barros Filho *et al.*, 2020) 56,34% em Curitiba – PR; Rodakiewicz *et al.*, (2018) encontraram 42,1% dos animais soropositivos para BLV, em 21 propriedades distribuídas nas quatro mesorregiões (oeste, serrana, norte e sul) do estado de Santa Catarina, Brasil (Figura 3).

Figura 2. - Médias (%) de soroprevalências da leucose enzoótica bovina calculadas por região de acordo com vários autores no Brasil.



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 3 - Médias (%) de soroprevalências da leucose enzoótica bovina calculadas por região de acordo com vários autores no estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: elaborado pela autora.

4.2.3 Importância econômica

Muitos prejuízos são causados pela LEB, principalmente, os custos com serviços veterinários, mortes de animais e restrições à venda de bovinos com linfossarcoma (Brenner *et al.*, 1989). As perdas em consequência à queda na produção em rebanhos leiteiros positivos para BLV variam em torno de 525 milhões de dólares para a indústria de laticínios nos EUA e 100 dólares por vaca por lactação no Brasil, valor altamente significativo especialmente para o pequeno produtor (Ott *et al.*, 2003; Rajão *et al.*, 2014). Obviamente os impactos econômicos diferem entre países onde a doença é endêmica, controlada ou erradicada (Batho *et al.*, 2008).

4.2.4 Importância para a Saúde Pública

O BLV foi identificado em tecido epitelial de glândulas mamárias humanas e associado a 59% dos casos de câncer de mama em mulheres, representando um fator de risco para o desenvolvimento da doença (Buehring *et al.*, 2014; Buehring *et al.*, 2015). Há possibilidade de correlação entre o consumo de carne e/ou leite com a maior frequência de desenvolvimento de câncer de mama em humanos (De Quadros *et al.*, 2023). No entanto se faz necessário o desenvolvimento de estudos mais prolongados e com maior número de casos para confirmar alguns achados; uma vez que a quantidade de alimento ingerido é um fator muito variável e

difícil de ser quantificada e correlacionada de forma correta para fundamentar tais afirmações (Matsumoto *et al.*, 2007; Buehring *et al.*, 2014).

Vários estudos identificaram a presença de DNA do BLV em tecido de mama canceroso, em taxa mais altas que em tecido de mama saudável (Mesa *et al.*, 2013; Buehring *et al.*, 2014; Baltzell *et al.*, 2018) e pelo menos um estudo indicou presença de anticorpos reativos contra a proteína do capsídeo do BLV em humanos (Buehring *et al.*, 2003). Recentemente um estudo realizado no Sul do Brasil encontrou fortes evidências sobre o envolvimento do BLV no câncer de mama, podendo ser utilizado como marcador molecular no diagnóstico precoce, ao ser um potencial fator predisponente ao desenvolvimento da doença. No entanto, estudos com número maior de amostras podem ser necessários para confirmar que o BLV é um agente zoonótico com grande impacto na saúde pública (Schwingel *et al.*, 2019).

4.2.5 Patogenia

A transmissão de BLV ocorre de várias formas, podendo ser vertical: via placenta ou durante o parto, periparto por meio da ingestão de colostro ou leite contaminado; horizontal: pelo contato com fluídos contaminados com linfócitos infectados, por via iatrogênica, durante procedimentos como palpação transretal, transfusão sanguínea, imunizações, assim como a presença de insetos hematófagos e o contato direto entre os animais (Kobayashi *et al.*, 2014; Ramalho *et al.*, 2020).

4.2.6 Sinais Clínicos

Na maioria dos casos a LEB apresenta-se na forma subclínica, no entanto aproximadamente 30% dos animais com mais de três anos de idade, desenvolvem linfocitose persistente e uma porcentagem menor, de até 5% o linfossarcoma. Existe ainda a forma aleucêmica, onde os animais apresentam anticorpos (anti-BLV) sem linfocitose persistente ou lesões tumorais (Beyer *et al.*, 2002).

Sinais clínicos inespecíficos ocorrem normalmente após dois anos de idade, e sua variação depende da localização e do grau de envolvimento do processo neoplásico nos órgãos vitais. Anemia, emagrecimento progressivo e infertilidade foram observados, embora sinais mais evidentes sejam linfonodos bilaterais aumentados, mais ou menos simétricos, exoftalmia

devido ao envolvimento de estruturas retro-oculares e presença de massas tumorais subcutâneas em diferentes localizações (Ramalho *et al.*, 2020).

4.2.7 Diagnóstico

O diagnóstico da LEB é imprescindível para que seja possível a adoção de medidas profiláticas e de controle. Pode ser realizado por meio de testes sorológicos e moleculares, com variações de sensibilidade e especificidade, vantagens e desvantagens, sendo considerados complementares no correto diagnóstico de infecção viral e no desenvolvimento da doença. Testes sorológicos como o de Imunodifusão em Gel de Ágar (AGID, *agar gel immunodiffusion*) e testes imunoenzimáticos (ELISA, *enzyme-linked immuno-sorbent assay*), direto e indireto, em soro ou leite, testes moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), nested-PCR e cultura de células mononucleadas do sangue periférico (PBMC), são produzidos comercialmente para o diagnóstico do BLV (Resende *et al.*, 2021; Woah, 2021).

A AGID foi considerada o teste de eleição por muitos anos, utilizada principalmente nos países Sul-Americanos, em função dos custos de produção, uma vez que eram produzidos no Brasil. No entanto, atualmente, não há kits AGID comercialmente disponível. Porém, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) apresentaram maior sensibilidade, com leitura mais rápida e objetiva. A limitação no seu uso está relacionada ao custo e tempo de importação do produto (Ramalho *et al.*, 2020; Resende *et al.*, 2021).

4.2.8 Tratamento, Controle e Prevenção

A LEB não possui tratamento eficaz, portanto, para mitigar a sua disseminação, os esforços são concentrados no controle e na prevenção da doença (Batho *et al.*, 2008). Para o controle e erradicação da LEB, a identificação dos animais positivos é o primeiro passo (Woah, 2021), pois possibilita a sua eliminação e a manutenção dos negativos (Johnson *et al.*, 1985).

Após a implementação de programas de controle e erradicação, na década de 1960, a doença foi controlada e eliminada com sucesso em diversos países. No entanto, estes programas, além da demanda de tempo e investimentos, uma vez que se obtenha o status de LEB-livre, a manutenção desse status requer medidas de prevenção e controle para evitar a

reintrodução da doença, bem como a notificação, caso venha a ocorrer novamente (Batho *et al.*, 2008).

Com relação a prevenção à LEB, a vacinação não é um método a ser considerado, haja vista, não existir uma vacina eficaz comercialmente disponível. Por isso, o conhecimento acerca da resistência dos animais a infecção pelo BLV torna-se extremamente importante, por possibilitar a seleção de animais resistentes como reprodutores em programas de melhoramento genético animal (Batho *et al.*, 2008).

Ao testar uma nova vacina para BLV, utilizou-se animais susceptíveis, baseando-se na associação do genótipo do BoLA-DRB3 à susceptibilidade à infecção experimental em bovinos. A genotipagem do BoLA mostrou claramente a vantagem de usar bovinos susceptível para estimar o efeito da vacina anti-BLV, drogas ou qualquer tratamento (Takeshima *et al.*, 2014).

O locus BoLA-DRB-3 (Bovine Leukocytes Antigens) está associado à resistência apresentada por alguns bovinos ao BLV, devido a características do hospedeiro ligadas ao Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) (Brujeni *et al.*, 2016). O conhecimento acerca dos genes de resistência e os programas de controle e profilaxia são fatores determinantes para a erradicação da LEB nos rebanhos bovinos tornando-se também grandes aliados da saúde pública (Batho *et al.*, 2008).

4.3. COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE PRINCIPAL

4.3.1. Estrutura tridimensional do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) são um conjunto de proteínas presentes nas células apresentadoras de antígenos (APC), que atuam como receptores destas células, reconhecendo e ligando a antígenos e apresentando-os para os linfócitos T, para sua degradação. O MHC é altamente conservado e polimórfico, sendo suas proteínas codificadas por mais de 200 genes, distribuídos em três *loci* distintos, que codificam as três diferentes classes de MHC: MHC-I, MHC-II e MHC-III, cada uma destas com funções distintas. As moléculas do MHC-I estão presentes em todas as células nucleadas, e apresentam antígenos para linfócitos T CD8+. As do MHC-II, são expressas em APCs especializadas, como as

dendríticas, macrófagos e linfócitos B e apresentam antígenos para os linfócitos T CD4+. As moléculas de MHC-III são proteínas do sistema complemento (Tizard, 2009).

A estrutura tridimensional das moléculas de classes I e II determinadas por cristalografia revelaram locais para ligação de peptídeos e interação com o receptor de antígeno das células T. O mapeamento dos peptídeos e o sequenciamento dos aminoácidos revelaram que a cadeia α da molécula MHC de classe I está organizada em três domínios: $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$. Os domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ são os domínios distais que formam a fenda de ligação ao antígeno (peptídeo) e o domínio $\alpha 3$ é o domínio proximal da membrana. O domínio $\alpha 3$ e a $\beta 2$ -microglobulina apresentam significativa semelhança entre si. Cada cadeia em uma molécula de MHC classe II contém dois domínios externos: domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e domínios $\beta 1$ e $\beta 2$. Os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ são os domínios distais da molécula de classe II que formam a ligação ao antígeno. Os domínios $\alpha 2$ e $\beta 2$ são proximais a membrana celular (Andersson *et al.*, 1988; Reiser *et al.*, 2014).

4.3.2. Organização Genômica da Região MHC

Em bovinos o gene MHC foi mapeado no cromossomo 23 (BTA23) e é definido como *Bovine Leukocytes Antigens* (BoLA) (Van Eijk *et al.*, 1992), em cabras também se encontra no cromossomo 23, e em ovelhas no cromossomo 20. Nestes ruminantes recebem nomenclatura de acordo com espécie, *Cahi* e *Ovar* respectivamente (Klein *et al.*, 1990; Amills *et al.*, 1998). A organização do BoLA difere do MHC em humanos, onde se encontra no cromossomo 6 (HLA) (Reiser *et al.*, 2014).

Em geral a estrutura do MHC é relativamente conservada em todas as espécies de mamíferos, e é dividida em três regiões, conforme sua função: classe I, classe II e classe III. O mapeamento do cromossomo 23 de bovinos, demonstrou que na região de classe I encontram-se aproximadamente 1,550 kilobases (kb) e são expressos dois loci fortemente ligados, BoLA-A e BoLA-B (Amills *et al.*, 1998).

A região de classe II em ruminantes é subdividida em classe IIa e classe IIb. A subclasse IIa apresenta os genes DR e DQ, sendo DQA e DQB comumente observados em duplicata (DQA1, DQA2, DQB1 e DQB2). A classe IIb apresenta os genes DMA, DMB, LMP2, LMP7, e TAP, envolvidos no processamento e transporte de antígenos, e outros genes de classe II DOB, DIB, DYA e DYB (Andersson *et al.*, 1988; Amills *et al.*, 1998).

A região de classe III é constituída por um conjunto heterogêneo de genes relacionados à resposta imune e outras funções como os fatores de complemento BF e C4, esteroides 21-hidroxilase (CYP21), proteínas de choque térmico 70 (HSP70) e fatores de necrose tumoral (TNF- α e TNF- β) (Bensaid *et al.*, 1991).

4.3.3. Complexo de Histocompatibilidade Principal – MHC Classe IIa, Sub-região DR

O gene DRA codificado na cadeia α , foi considerado monomórfico por muito tempo, por possuir apenas um alelo relatado, BoLA-DRA. No entanto, estudos tem demonstrado variação potencial no éxon 2 do locus DRA bovino. Analisaram-se amostras de 384 bovinos na Nova Zelândia e identificaram-se a presença de quatro alelos no éxon 2. Por outro lado, os genes que codificam a cadeia β são altamente polimórficos (Zhou *et al.*, 2007). O polimorfismo está concentrado principalmente no segundo éxon, que codifica a porção variável do local de ligação do peptídeo. Em bovinos o gene DRB possui pelo menos três loci, mas apenas o gene DRB3 é funcional. BoLA-DRB1 é um pseudogene com códons de parada, localizado na região β 1 transmembrana e apresenta baixo polimorfismo. BoLA-DRB2 é expresso em níveis muito baixos e é monomórfico (Hedrick *et al.*, 2000). A existência de vários genes de cadeia β aumenta a possibilidade de provocar uma resposta imune eficaz contra peptídeos derivados de patógenos que diferem significativamente em suas características estruturais (Amills *et al.*, 1998).

4.3.4. Polimorfismo Alélico do Loci BoLA-DRB3

A caracterização de polimorfismo em uma população de bovinos na América do Sul foi realizada por meio do sequenciamento do éxon 2 do gene BoLA-DRB3 em 421 zebuínos, juntamente com a análise de dados de 1416 taurinos e zebuínos, nos quais identificaram 46 alelos relatados anteriormente e nenhuma nova variação. Os resultados mostraram que as diferenças existentes entre raças taurinas e zebuínas se devem à origem, seleção e adaptação. Tais informações alélicas serão importantes para investigar a relação existente entre MHC e doenças, e contribuem para catalogar a frequência alélica do MHC de acordo com a raça e localização (Takeshima *et al.*, 2018).

A caracterização da diversidade do MHC de bovinos em raças Crioulas da América Latina, por meio de sequenciamento do BoLA-DRB3.2 em 179 amostras revelaram alta

diversidade genética, que pode ser explicada pelas múltiplas origens do germoplasma Crioulo (Europeu, Africano e Indiano), tal diversidade pode ser mantida com equilíbrio na seleção (Giovambattista *et al.*, 2013).

Polimorfismo do gene BoLA-DRB3 também foi avaliado em bovinos na raça Hartón del Valle (HV). O estudo demonstrou que o HV possui alta diversidade genética e a origem deste polimorfismo pode ser em parte devida à origem da raça e esta alta variabilidade pode ser mantida mediante equilíbrio de seleção (Hernández-Herrera *et al.*, 2015).

4.3.5. Locus BoLA-DRB3 associados a Resistência e Susceptibilidade à LEB

Acredita-se que a resistência apresentada por alguns bovinos ao BLV está relacionada com características do hospedeiro ligadas ao MHC (Brujeni *et al.*, 2016). O locus BoLA-Aw7 determinou a resistência dos bovinos à LEB, enquanto o BoLA-Aw12 a susceptibilidade (Tizard, 2009). Acredita-se que o tipo de resposta imune contra os peptídeos do BLV esteja associado aos alelos deste gene, no entanto é necessário um aprofundamento nos estudos de haplótipos específicos de resistência (Mirsky *et al.*, 1996; Zanotti *et al.*, 1996). O conhecimento acerca dos genes de resistência e os programas de controle e profilaxia são fatores determinantes para a erradicação da LEB nos rebanhos tornando-se também grandes aliados da saúde pública.

O polimorfismo do gene DRB3 também foi investigado e associado a LEB em bovinos Crioulo Colombiano. Os alelos *1101 e *2703 foram identificados e positivamente associados à diminuição da infecção viral, baixo desenvolvimento de linfocitose, aumento de anticorpos para leucose e diminuição da carga proviral. Esses animais foram considerados resistentes ao desenvolvimento e/ou progressão da enfermidade (Hernández-Herrera *et al.*, 2015).

Takeshima *et al.*, (2014) testaram uma nova vacina para BLV e confirmaram a associação do genótipo do BoLA-DRB3 à susceptibilidade à infecção experimental em bovinos, utilizando técnica de transplante de óvulo fertilizado susceptível. A genotipagem do BoLA mostrou claramente a vantagem de usar bovino susceptível para estimar o efeito da vacina anti-BLV, drogas ou qualquer tratamento.

Genes BoLA são amplamente utilizados como marcadores de doenças e características imunológicas em bovinos. Na LEB além do diagnóstico a carga proviral é um importante índice na determinação da progressão da doença e risco de transmissão. Takeshima *et al.*, (2019) investigaram a frequência dos alelos BoLA-DRB3, BoLA-DQA1 e haplótipos do MHC classe

II em vacas Holandesas no Japão e concluíram que a carga viral está fortemente associada ao polimorfismo destes alelos. Estes resultados podem ser úteis na eliminação de vacas com BLV, sem a necessidade de separar em lotes, positivo e negativo.

Alelos de resistência do gene BoLA DRB3.2 (*1101, *2709 e *20012) foram observados em maior frequência em bovino crioulo Colombiano quando comparados com alelos de susceptibilidade, conferindo baixa presença de LEB para a raça, em meio à alta prevalência da doença no país (Hernández-Herrera *et al.*, 2011).

4.3.6. Resistência X Susceptibilidade à outras doenças

Polimorfismo dos alelos BoLA-DRB3 e sua influência na incidência de mastite clínica, ocorrência de retenção de placenta, cistos ovarianos, abscessos uterinos e contribuição para características de produção de leite foram avaliados e 23 alelos identificados. O alelo 22 apresentou associação com mastite, sendo que nas vacas que possuem cópia deste alelo a frequência de ocorrência de mastite está diminuída e a produção de leite aumentada, quando em comparação àquelas que não possuem o alelo (Pokorska *et al.*, 2018).

Foram analisados rebanhos 5/8 Girolando e Holandês do estado de Pernambuco, para avaliar os polimorfismos do gene BoLA-DRB3.2 associados à mastite. Identificaram-se 39 alelos, revelando alta variabilidade caracterizando-se com alto valor genético para a pecuária, devendo essas informações serem consideradas em programas de melhoramento genético nacional (Vilaça, 2016).

Da Mota *et al.*, (2002) avaliaram a distribuição dos alelos BoLA-DRB3 em bovinos de leite da raça Gir. Dezessete alelos BoLA-DRB3 foram identificados, incluindo alguns que foram descritos apenas recentemente para o bovino zebu.

Ao avaliar o polimorfismo do BoLA-DRB3 e sua influência na produção leiteira em vacas Gir, foram identificados sete alelos BoLA-DRB3.2*4, *8, *11, *19, *28, *41 e *48 que não haviam sido encontrados em zebuínos. Dois alelos *16 e *29 estavam significativamente associados com maiores produções de leite, sugerindo que o próprio loco BoLA-DRB3.2 ou um QTL a ele ligado influenciaria a produção de leite nas vacas Gir (Machado *et al.*, 2005).

Dados revelaram que bovinos Wanbei são resistentes à indução viral de febre aftosa, graças à presença de mutação em uma proteína que altera a estrutura e a regulação celular que ocorreu durante o longo processo de evolução. Os resultados foram obtidos pela investigação e

associação entre polimorfismo do gene BoLA-DRB3 e a resistência/suscetibilidade à febre aftosa em 100 amostras de bovinos Wanbei (Lei *et al.*, 2012).

4.4. Considerações Finais

A intensa seleção voltada às características de produção ocasionou aumento na incidência de doenças, de modo que a identificação de genes ou regiões cromossômicas e suas associações com a resistência às doenças se faz urgente. Portanto, definir a estrutura, função e diversidade deste sistema é muito importante para entender a resposta imune em vertebrados. A análise molecular e o mapeamento detalhado de doenças associadas provavelmente desempenharão um papel central na genética e na medicina veterinária por muitos anos. A crescente resistência de microrganismos patogênicos aos antibióticos e outros medicamentos torna indispensável a compreensão das bases genéticas moleculares de resistência à doenças infecciosas. A combinação de seleção assistida por marcadores para resistência a doenças específicas e vacinas peptídicas que usam informações sobre motivos de ligação, provavelmente contribuirão para melhorar a saúde única, no futuro próximo. Tendo como objetivo identificar e selecionar animais os quais além de produtivos tenham características de resistência ou tolerância a doenças, e a posterior utilização deste material genético em programas de melhoramento animal.

5. ARTIGO 1

O artigo será submetido a revista Microbial Pathogenesis

Quantifying the Enzootic Leukosis Virus Threat: How Prevalent is Natural Infection in Crioulo Lageano Cattle in Southern Brazil?

Graziela Vieira Fontequê^{1,2*}, Mariana da Silva Casa¹, Zigomar da Silva³, Carla Ivane Ganz Vogel⁴, Joandes Henrique Fontequê⁴, Ubirajara Maciel da Costa⁴, Mere Erika Saito, Guillermo Giovambattista⁵, Shin-Nosuke Takeshima⁶, Luiz Claudio Miletto^{4*}

1- Graduate Program in Animal Science (PPGCA), State University of Santa Catarina (UDESC), Lages, Brazil.

2- Centro Universitário UNIFACVEST: Lages, SC, BR.

3- Department of Animal Science, McGill University, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada.

4- Department of Animal Production, State University of Santa Catarina (UDESC), Lages, Brazil.

5- IGEVET – Institute of Veterinary Genetics (UNLP-CONICET LA PLATA), Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, La Plata, Argentina.

6- Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Life, Jumonji University, 2-1-28 Sugawara, Niiza, Saitama, Japan.

* Correspondence author. gvieirafontequê@gmail.com

Abstract

Enzootic Bovine Leukosis (EBL) is a chronic, cosmopolitan infectious and contagious disease caused by the enzootic bovine leukosis virus (BLV), affecting both beef and dairy cattle, leading to substantial economic losses. The bovine Crioula Lageana breed is a locally adapted Brazilian breed at risk of extinction according to the FAO, characterized by high genetic variability that permits its utilization in conservation and genetic improvement programs. Therefore, the preservation of this breed is essential and requires, among others, the assessment of the health status, with the determination of the prevalence of natural BLV infection. Blood samples were taken from 308 animals from different categories: bulls, cows, heifers and male and female calves; from six farms located in nuclei of in situ conservation for Crioula Lageana breed in

Planalto Serrano de Santa Catarina, Brazil and were analyzed with hemogram, ELISA and PCR tests. There was a prevalence of 6.82 % (21/308) for the ELISA test and 36.69 % (113/308) for the PCR technique. There was no association between categories and natural infection or BLV positivity in PCR by the Chi-square test ($P < 0.05$). Leukocytosis with lymphocytosis was observed in 11% (18/113) of PCR-positive animals. No animal showed the form of bovine lymphosarcoma. We conclude that the BLV is present in Crioula Lageana cattle, requiring the establishment of prevention and control measures to avoid the spread of the disease within the herd.

Keywords: ELISA, PCR, Creole cattle, Enzoitic Bovine Leukosis, Bovine Leukemia Virus.

Introduction

The Crioula Lageana bovine breed is known for its rusticity and high productivity in the hostile climate environment of the Serrano Plateau of the state of Santa Catarina, Brazil, due to the selection and improvement work to which it has been subjected for decades, there has been a recovery and maintenance of the genetic material [1]. In this sense, the horned and polled varieties were developed, which have been raised for meat and milk production and dairy production [2]. The breed has proven its high genetic variability and association of alleles with disease resistance, such as babesiosis [3]. The continuity of this breed represents the existence of an unrivalled bank of genetic resources for the bovine species. However, the breed was recently listed on the extinction risk list of the Food and Agriculture Organization (FAO) and still has a small number of individuals, currently constituting a population of 1,316 animals in 2017, according to the last FAO count [4].

Among the various infectious diseases, EBL is extremely important for cattle milk and meat production. EBL is cosmopolitan infectious and contagious disease, also called bovine lymphosarcoma, that is a natural infection of cattle caused by the enzootic bovine leukosis virus. BLV, which naturally infects cattle, belongs to the retroviridae family, which integrates into the DNA of the host genome, forming a provirus that allows viral replication [5]. BLV has a tropism for leukocytes, especially B-lymphocytes causing several immunological dysfunctions, varying in intensity according to the viral charge and infection time [6]. After infection, BLV replicates, causing persistent lymphocytosis that could not cause a major health impact. After around seven years of infection, the B-lymphocytes can replicate irregularly, giving rise to malignant lymphocytic tumours, which can be lymphoma or lymphosarcoma, which can affect different organs and cause the death of the animal [6, 7].

EBL also, due to the involvement of B-lymphocytes, causes immunodeficiency, which compromises the health of the animal mainly in the peripartum and contributes to the occurrence of other diseases like mastitis [8]. EBL presents in a subclinical form most of the time, causing enormous economic losses that include, in addition to the costs of veterinary services, a drop-in milk production, a reduction in reproductive efficiency, a decrease in productive life, animal deaths, and restrictions on the sale of cattle. Due to the drop in milk production alone, the EBL led to an estimated loss of \$ 525 million in 2003 [9]. EBL also compromises public health by being associated with breast cancer [10]. The virus was identified in oncological breast tissue in humans, making it possible to correlate the consumption of meat and/or milk with a higher frequency of disease development [11, 12], as it has already been found in the milk and meat of this species [13]. On the other hand, another study did not find any BLV proviral DNA or antibodies in human tissue [14].

EBL can be transmitted in different ways, including horizontal transmission, animal-to-animal contact, iatrogenic, arthropods, and vertically or congenital, from mother to calf, in utero or during the peripartum period, or through suckling, either through colostrum or milk [9]. Due to these many ways of transmission, EBL is widespread around the world, including in Brazil, which means an increase in risk for already endangered species such as the Crioula Lageana breed [4].

In Brazil, serological prevalence research has been conducted in both beef and dairy cattle across all regions of the country, ranging from 9.2% [15] to 79.7% [16]. The only study on enzootic leukosis prevalence in the state of Santa Catarina was carried out by Rodakiewicz et al. [17] in Holstein, Jersey and crossbred cattle used for milk production. The prevalence was 42.1% (191/454) in the IGDA.

Furthermore, since there is no cure or vaccine commercially available to date [18], it is necessary to adopt prevention and control measures through the identification and segregation of positive animals. Identifying the positive animals is the first step to controlling and eradicating BLV in a population [18], which enables the segregation of positive and negative animals to create an EBL-free herd.

The objective of this study was to determine the prevalence BLV natural infections in Crioula Lageana cattle in the Planalto Serrano of Santa Catarina state, Brazil. To the best of our knowledge, this is the first study on the prevalence of EBL in the Crioula Lageana breed, and it is extremely important to identify the health situation of the herds.

Material and methods

Sample size determination

The prevalence of natural infection by the enzootic leukosis virus (EBL) in Crioulo Lageano cattle population was evaluated using the formulas proposed by Pan Americana Health Organization (PAHO) in (1979) [19], as follows:

$$n_0 = \frac{1.96^2[p(1-p)]}{(d)^2}$$

Wherein: n_0 represents the number of samples, p is the expected prevalence, and d symbolizes the margin of error.

Assuming a 50% prevalence of positive samples, a 95% confidence interval, and a 5% margin of error, a sample size of 384 animals was estimated. However, since this is a finite population, further calculations were performed:

$$n = \frac{N \times n_0}{N + n_0}$$

Wherein: N is the total number of animals in the population, which comprises 1500 animals of the Crioula Lageana breed.

These calculations resulted in the amount of 306 animals to be sampled.

Animals and ethics.

Project approved by n°2461171115 of the Committee for Ethics in Animal Experimentation (CEUA) from Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). All animals were registered with the Crioula Lageana Cattle Breeders Association (ABCCL) Cattle of the Crioula Lageana breed (Figure 1) were used, coming from conservation nucleus properties *in situ*, located in four different towns (Figure 2): Lages (Latitude: -27.8167°, Longitude: -50.3264 27° 49' 0" S, 50° 19' 35" W, Altitude 930 m) two farms; Paineel (Latitude: 27° 55' 30" S, Longitude: 50° 6' 12" W, Altitude 1.101 m) one farm; Ponte Alta (Latitude: 27° 29' 03" S, Longitude: 50° 22' 49" W, Altitude: 856 m) two farms; and Curitibaanos (Latitude: 27° 16' 58" S, Longitude: 50° 35' 04" W, Altitude 987 m) one farm.

The climate, according to the Köppen classification, is Cfb, characterized as a humid mesothermal climate with cold winters and mild summers, featuring an average annual rainfall of 1,500 mm and an average temperature of 16°C. The vegetation primarily consists of Campos do Planalto das Araucárias, and around the valleys of the Pelotinhas and Lava Tudo rivers, there is the Mixed Ombrophilous Forest with Araucaria trees [20]. The Plateau of Santa Catarina

experiences evenly distributed rainfall throughout the year, without a defined dry season. Temperatures are moderate, averaging 16.5°C, with a maximum variation of 8 to 10 degrees between summer and winter. Frost occurs in the higher altitude areas during autumn, winter, and spring, and exceptionally in summer in the southern plateau region. Snowfall is observed in certain locations during winter. In Santa Catarina, a significant portion of the livestock in the Serrano Plateau region thrives on natural grasslands, primarily composed of coarser and tufted grasses such as *Aristida*, *Andropogon*, *Schizachyrium*, *Elyonurus*, and *Trachypogon* [21].

Blood samples were obtained from 308 animals, including the five available categories, 32 bulls, 140 cows, 65 heifers, 30 male calves, and 41 female calves. Blood samples were collected via venipuncture from the external jugular vein into vacuum tubes, with anticoagulant (10% EDTA) for hemogram and PCR, and without for ELISA Assays. Samples without anticoagulant, after phase separation of the serum was stored in a freezer at -20°C until for the ELISA test. The samples with EDTA was kept at -20°C until DNA extraction and PCR assay.

Hematology

The total number of leukocytes was measured using the automated blood cells counter SDH3 Cleaner (Labtest, Lagoa Santa, Brazil). A leukocyte differential count was performed using microscopic analysis of blood smears stained with Romanowsky-type stains (Fast Panoptic) [22]. After PCR and leukograms results, the animals were divided into four different groups, being negatives, with animals PCR-negatives and without hematological alterations; positives without leukocytosis, with animals BLV-positives in PCR, not presenting leukocytosis; Positives leukocytic non-lymphocytic: with animals BLV-positives in PCR, presenting a no-lymphocytic leukocytosis; and Positives leukocytic with lymphocytosis, with animal BLV-positives in PCR and presenting a leukocytosis with lymphocytosis. Leukocytosis was considered when the total leukocyte was greater than $15 \times 10^3/\mu\text{L}$ e lymphocytosis when the total lymphocyte counting was more than $10 \times 10^3/\mu\text{L}$ [23].

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

To carry out the enzyme immunoassays, the serum samples were thawed, and after thawing, they were used for the detection of antibodies against EBL using commercial ELISA reagents (Bovine Leukaemia Virus Antibody Test Kit, Veterinary Medical Research and Development, VMRD, Pullman, WA, EUA).

Polymerase chain reaction (PCR)

Cellular fraction samples were used for DNA extraction and subsequent PCR analysis. DNA extraction was performed using the ReliaPrep™ gDNA Miniprep System (Promega, WI, USA) according to the manufacturer's instructions and used for amplification of the 440 pb fragment of the EBL virus *env* gene. The PCR reaction took place in a final volume of 25 µL of reaction, containing 1 U of Taq Polymerase enzyme GoTaq® Hot Start Polymerase, (Promega, WI, USA); 8.5 pmoles of each primer: OBLV1A (5'-CTTTGTGTGCCAAGTCTCCCAGATACA-3') and OBLV6A (5'-CCAACATATAGCACAGTCTGGGAAGGC-3') [24], 0.2mM nucleotides (dNTPs); 3.5mM magnesium chloride; 5µL of 5 X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega, WI, USA); 3 µL of DNA (concentration between 20 and 100ng/µL) and ultra-pure water to complete the volume. Positive and negative controls were used for each reaction.

The temperature conditions applied in the thermal cycler Biocycler® (Biosystems, Brazil) were: 94 °C for five minutes, followed by five cycles of 94 °C for 45 seconds, 60 °C for 1 minute, and 72 °C for 90 seconds, followed by 35 cycles of 94 °C for 45 seconds, 59 °C for 60 seconds, and 72 °C for 90 seconds, and the last cycle of final extension at 72°C for 7 minutes. The electrophoresis of the amplification products was carried out in a horizontal tank in a 2% agarose gel with the addition of Unisafe Dye 20,000x (Uniscience, Brazil). A 100 pb molecular weight marker was used as a standard to determine the size of the sample bands. The electrical source conditions were 140 Volts and 400 mA for 40 minutes, and visualization was achieved by exposure to ultraviolet light. Bands with a size close to 440 pb were considered positive for BLV.

Statistical analysis

To calculate the prevalence, a descriptive statistical analysis of the data was carried out, with the calculation of the prevalence rate in the sample population by property and by category. The categories were separated by sex and age group, males over two years old, cows over two years old, heifers between one and two years old, and calves and heifers up to one year old. The categories were compared using the Chi-square test ($P < 0.05$) between positives and negatives for the natural infection with BLV. The leukogram results were compared among groups using

the Kruskal-Wallis test ($P < 0.05$) after being assessed by the Shapiro-Wilk Normality Test ($P < 0.05$).

Results

Prevalence of BLV Natural Infection in Crioulo Lageano

The prevalence of EBL was evaluated in 308 bovine animals of the Crioulo Lageano breed on six different farms using ELISA and PCR assays. We found an overall prevalence of 6.82% (21/308) for the ELISA test (Table 1) and 36.68% (113/308) for PCR (Table 2).

Prevalence BLV Natural Infection in Crioulo Lageano cattle of different ages

For the ELISA test, the seroprevalence of VBL among different animal categories was 9.37% (03/32) for bulls; 9.28% (13/140) for cows, 6.15% (04/65) for heifers and 3.33% (01/30) for male calves. None of the evaluated female calves showed VBL serum reactivity (Figure 1A). When PCR was used, the positive detection of BLV was 31.25% (10/32) for bulls; 40.71% (57/140) for cows; 35.38% (23/65) for heifers (10/30); 33.33% (10/30) of female calves; and 31.71% (13/41) of male calves (Figure 1B). There was no difference between sex and categories by Chi-square Test between positives and negatives for the natural infection with BLV ($P > 0.05$) (Table 3).

Prevalence of BLV in Crioulo Lageano cattle in different farms

The seroprevalence for BLV among the different farms was also compared, showing farm A 7.78% (14/90); B 0% (0/17); C 6.56% (4/61); D 7.89% (3/38); E 13.33% (4/30); and F 4.16% (3/72) (Figure 2A), with no differences ($P < 0.05$) found for ELISA. The prevalence of BLV in PCR among the different farms was also compared with farm A 33.33% (30/90); B 0% (0/17); C 54.1% (33/61); D 31.58% (12/38); E 20% (6/30); and F 44.44% (32/72) (Figure 2B) with no difference ($P < 0.05$).

Hematology of BLV in Crioulo Lageano

The blood analysis showed that all animals BLV-negative on PCR also were no-leukocytic (Table 4). The results for each group were: group Negative 63.31% (195/308); group Positive without leukocytosis 29.54% (91/308); group positive with leukocytosis without lymphocytosis 1.29% (4/308); and group positive with leukocytosis with lymphocytosis 5.84%

(18/308) (Table 5). The prevalence of positive animals with leukocytosis with lymphocytosis was 11% (18/113) in PCR. Among the animals presenting persistent lymphocytosis, the results for each category were: bull 3.12% (1/32), cows 2.14% (3/140), heifers 2.14% (3/140), male calves 26.66% (8/30), and female calves 7.31% (3/41).

Discussion

To our knowledge, this is the first work on the prevalence of natural infection of the bovine enzootic leukosis virus (BLV) in cattle of the Crioula Lageana breed. In this study, we used two assays, ELISA and PCR, which are the most common methods to detect BLV [10], to assess the prevalence of BLV in six different herds. According to the World Organization for Animal Health (WOAH), both ELISA and PCR are recommended tests for the identification of EBL [18]. The serological test, on the other hand, may give a false negative if it looks for antibodies against gp51 because the animals may not have enough antibodies when the blood is taken, especially if they are recently infected, pregnant, or have humoral immune failures occur [18]. As for the PCR, we used it to identify the presence of the *env* gene, as it is one of the most used in PCR tests [10, 24] due to encoding viral proteins (gp51) that determine BLV infectivity [25].

The prevalence was of 6.82 % (21/308) for the ELISA test and 36.69 % (113/308) for the PCR technique. Our data indicate a low EBL seroprevalence based on ELISA tests, similar to some studies. For example, in Turkey, which presented a 2% prevalence in dairy cattle [26], 7% of a mixed herd of Friesian/native cattle crossbred with pure native cattle was EBL positive in Iraq [27], and 11% in Holstein and Brown Swiss in Chile [28]. On the other hand, other studies showed a great prevalence of EBL. In Colombia, in a study with dairy cattle, 19.8% of ELISA-tested animals were positive for BLV [29], while in the USA, 33.6% and 47.6% of beef and dairy cattle were BLV positive, with an average prevalence of 38.6% [30]. Even higher prevalence was presented in dairy cattle in Venezuela (60.83%) [31], and Iran (81.9%) [32]. Other locally adapted or creole breeds have also conducted prevalence studies for EBL. Curraleiro Pé-Duro cattle from Brazil showed an average serum reactivity of 21.1% on the IGDA test [33]. In Hartón Del Valle Creole cattle from Colombia, a seroprevalence of 30.3% was identified [34]. Both breeds showed a higher prevalence than that we presented for Crioula Lageana cattle detected in the present study.

Regarding the PCR characterization of BLV infection, we found that Crioula Lageana cattle presented a prevalence of 36.69%, with no difference among the different categories. Our

results are similar to those found in Hartón Del Valle Creole cattle; 38.3% of the animals tested positive for PCR [34], but higher than in a native Iraqi breed, in which 8.3% were PCR-positive for BLV[26]. In a study of Pyar Sein breeds, Friesian, Jersey, and Pyar Ni breeds from several ages, ranging from three months old to 11 years old, in Myanmar, 9.1% of animals were BLV-positive in PCR; however, the prevalence for each breed was not presented [35].

In this study, the prevalence of EBL detected by PCR, when compared among animal categories, ranges from zero in female calves to 9.37% for bulls, the category with the highest prevalence, followed by cows, with a similar prevalence of 9.28%. However, there was no difference ($P<0.05$) among the categories. This result differs from those that indicates that adult animals show a higher prevalence due to BLV [33]. The increase in the frequency of positives as age advances may be related to a higher likelihood of contact between infected and non-infected animals, due to their longer tenure within the herd [33].

When analyzing the infection among farms, 83.33% (5/6) of farms had positive animals both in ELISA and in PCR analysis, with an average prevalence of 6.81% in ELISA and 36.68% for PCR, which is 5.38-fold higher than that for ELISA. This occurred because to obtain positive results using the ELISA test, the animal needs to present antibodies, which in turn depends on the viral load and incubation time [36]. Once the virus has infected this animal, its DNA will be present and therefore will be identified at any time, which justifies the disparity of results when comparing both used tests. PCR techniques do not replace serological tests; however, they are complementary ways that effectively identify the presence of early infection when we still do not have the production of antibodies [18]. One of the analyzed farms tested negative for both ELISA and PCR, which is probably the result of the adoption of handling techniques to prevent the entry of BLV since depending on the handling used influences the prevalence of EBL in the herd, as shown in other studies [29, 37] or the absence of contact of between the cattle and virus in this farm. Interestingly, despite the lower or higher prevalence, no animal presented symptoms or presented the disease, i.e. lymphosarcoma, during this study. However, 11% (18/113) of BLV-positive animals in PCR showed leukocytosis with lymphocytosis. Persistent lymphocytosis can be found in 30 to 70% of infected cattle, often accompanied by lymphocytic atypia. BLV primarily infects B lymphocytes, altering cellular morphology and modulating the apoptotic process [38].

In our study, due to logistical issues, a second blood sample collection to characterize persistent lymphocytosis was not performed. Persistent lymphocytosis can be confirmed by repeating the hemogram after 72 days [38].

This indicates that the animals are exposed to the virus, and are infected, and few animals have developed leukocytosis with lymphocytosis. None of the cattle developed the clinical form of lymphosarcoma. On the other hand, despite the absence of clinical signals, once the disease is present in the herd, the infected animals could be a source of infection for other animals on the farm.

Cattle naturally infected with BLV had consistently shorter lifespans compared to their negative counterparts, suggesting that the infection could be one of the main causes of premature culling or death of the animals [39].

Conclusion

According to our understanding, this is the first study on the prevalence of leukosis in cattle of the Crioula Lageana breed. We identified that BLV is present in the breed, requiring the institution of prevention and control measures to prevent the spread of the disease within the herds. Identifying all animals and separating positive and negative herds is one of the measures that can be adopted. All BLV-positive animals can be a source of infection for other animals on the property or in other herds.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Crioula Lageana Cattle Breeders Association (ABCCL) and the six farms proprietaries.

Figures and legends

Figure 1 Specimens of Crioula Lageana cattle, reared on native pasture, from an *in situ* conservation nucleus. Important to observe the variety in hair colour and the long horns. Municipality of Painei, Santa Catarina, Brazil.



Figure 2. Highlighted (a), is Brazil’s Southern region, emphasizing the state of Santa Catarina, where the experiment took place, in the darkest shade of gray; The four municipalities where six *in situ* conservation sites for the Crioula Lageana cattle breed are located, within the state of Santa Catarina, Brazil (b).



Figure 3 - Prevalence of enzootic bovine leukosis (EBL) detected by ELISA and PCR tests in different categories of 308 Crioula Lageana cattle Planalto Serrano, Santa Catarina, Brazil.

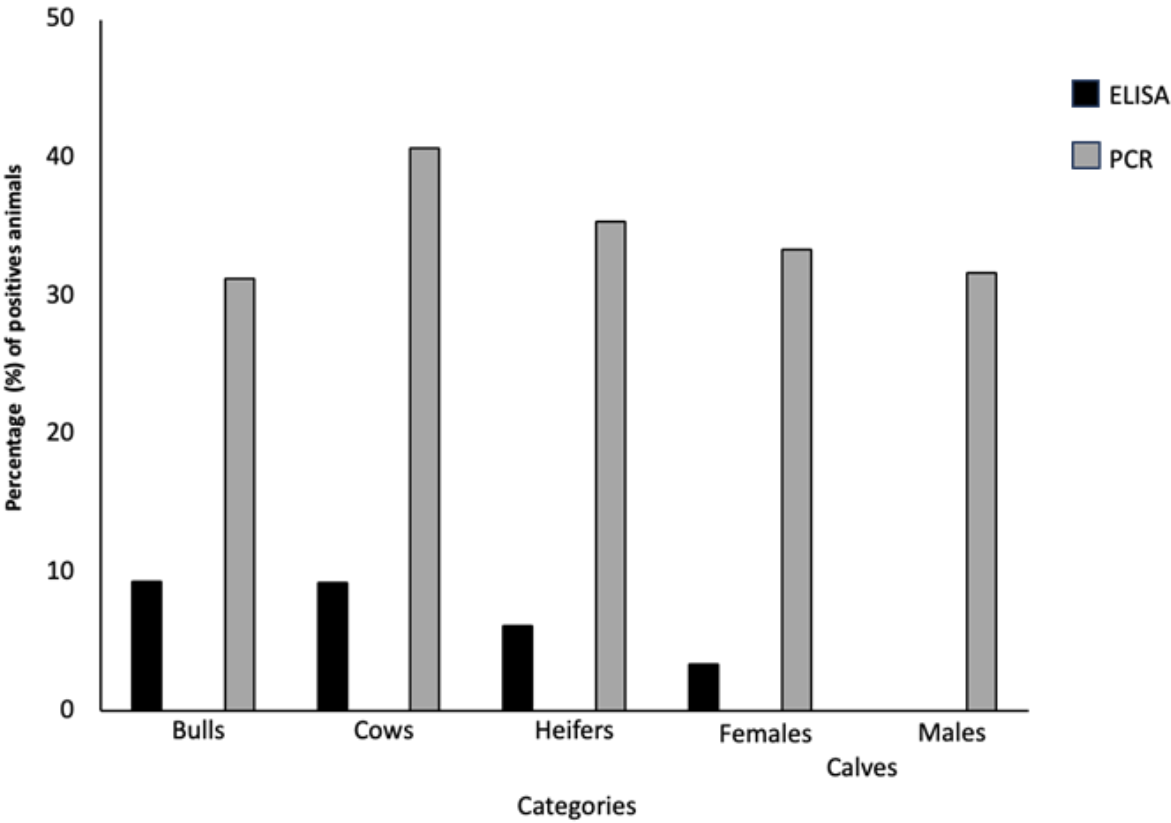


Figure 4 - Prevalence of enzootic bovine leukosis (EBL) detected by ELISA and PCR tests in 308 Crioula Lageana cattle of six different farms in the Planalto Serrano, Santa Catarina, Brazil

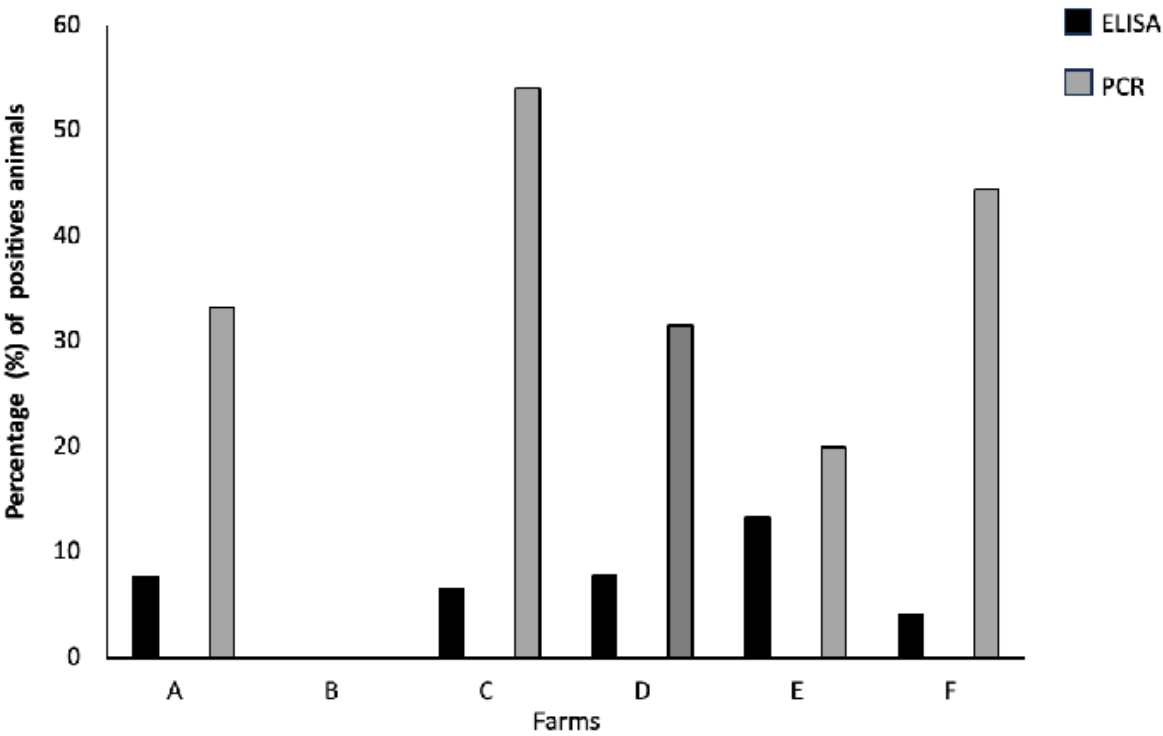


Table 1 - Seroprevalence of enzootic bovine leukosis (EBL) in 308 Crioula Lageana cattle using the ELISA test, in different classes, in six farms in Planalto Serrano, Santa Catarina, Brazil.

Farm	Samples		Bulls		Cows		Heifers		Calves			
									Males		Females	
	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+
1	90	7	4	1	15	4	40	2	6	0	25	0
2	17	0	0	0	7	0	6	0	2	0	2	0
3	61	4	5	1	39	3	3	0	13	0	1	0
4	38	3	3	0	19	3	8	0	1	0	7	0
5	30	4	0	0	22	2	7	2	1	0	0	0
6	72	3	20	1	38	1	1	0	7	1	6	0
Total	308	21	32	03	140	13	65	04	30	01	41	00

Table 2 - Prevalence of enzootic bovine leukosis virus (BLV) in 308 Crioula Lageana cattle using PCR, in different classes, in six farms in Planalto Serrano, SC, Brazil.

Farm	Samples		Bulls		Cows		Heifers		Calves			
									Males		Females	
	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+	N	+
1	90	30	4	0	15	5	40	17	6	0	25	8
2	17	0	0	0	7	0	6	0	2	0	2	0
3	61	33	5	2	39	25	3	0	13	6	1	0
4	38	12	3	2	19	1	8	5	1	0	7	4
5	30	6	0	0	22	5	7	1	1	0	0	0
6	72	32	20	6	38	21	1	0	7	4	6	1
Total	308	113	32	10	140	57	65	23	30	10	41	13

Table 3 - Prevalence of the bovine enzootic leukosis virus (BLV) in 308 Crioula Lageana cattle breed using PCR, in the different classes and associations using the Chi-Square test (χ^2), in six farms in Planalto Serrano, Santa Catarina, Brazil.

Categories		BLV positives		Chi-squared			
Bulls		31% (10/32)	----	----	---	---	---
Cows		40% (57/140)	P=0.321	---	---	---	---
Heifers		35% (23/65)	P=0.686	P=0.490	---	---	---
Calves	Females	32% (13/41)	P=0.967	P=0.313	P=0.697	---	---
	Males	33% (10/30)	P=0.861	P=0.470	P=0.885	P=0.831	---

Table 4 - Mean values and standard deviations ($\bar{x} \pm \text{sd}$) of the leukocyte count, total number of leukocytes, rod neutrophils, segmented neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, and basophils of 308 Crioula Lageana cattle positive and negative for enzootic bovine leukosis using polymerase chain reaction (PCR) in the Planalto Serrano, Santa Catarina, Brazil.

Cell types	Negatives (n=195)	Positives without Leukocytosis (n=91)	Positives leukocytic non- lymphocytic (n=4)	Positives leukocytic lymphocytic (n=18)
Leukocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	12.80 $\pm$ 4.91 ^a	10.71 $\pm$ 2.93 ^b	17.35 $\pm$ 2.3 ^{ac}	21.80 $\pm$ 6.20 ^c
Band neutrophils ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.03 $\pm$ 0.08 ^a	0.02 $\pm$ 0.07 ^a	0.04 $\pm$ 0.08 ^a	0.06 $\pm$ 0.13 ^a
Segmented neutrophils ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	3.40 $\pm$ 2.55 ^{ab}	2.76 $\pm$ 1.55 ^b	6.58 $\pm$ 3.32 ^{acd}	5.84 $\pm$ 5.27 ^{ad}
Lymphocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	8.06 $\pm$ 3.52 ^a	6.75 $\pm$ 2.54 ^{bc}	8.41 $\pm$ 1.53 ^{ac}	14.43 $\pm$ 3.94 ^d
Monocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.39 $\pm$ 0.34 ^a	0.41 $\pm$ 0.39 ^a	0.68 $\pm$ 0.09 ^{ac}	0.83 $\pm$ 0.81 ^{bc}
Eosinophiles ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.70 $\pm$ 0.71 ^a	0.65 $\pm$ 0.54 ^a	1.64 $\pm$ 1.68 ^a	0.62 $\pm$ 0.81 ^a
Basophiles ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.01 $\pm$ 0.04 ^a	0.01 $\pm$ 0.04 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	0.01 $\pm$ 0.05 ^a

Different letters indicated statistical differences ($P < 0.05$).

Table 5 – Percentage and number over total of animals in each category negative for BLV in PCR and not presenting leukocytosis, positive without leukocytosis, positive with nonlymphocytic leukocytosis and with persistent lymphocytosis in 308 Crioula Lageana cattle in the Planalto Serrano, Santa Catarina, Brazil.

Categories	Groups			
	Negatives	Positives without Leukocytosis	Positives leukocytic non-lymphocytic	Positives leukocytic lymphocytic
Bulls	68.75% (22/32)	28.12% (9/32)	0% (0/32)	3.12% (1/32)
Cows	59.28% (83/140)	36.42% (51/140)	1.42% (2/140)	2.14% (3/140)
Heifers	63.07% (41/65)	30.76% (20/65)	1.53% (1/65)	4.61% (3/65)
Calves	Females	66.66% (20/30)	6.66% (2/30)	0% (0/30)
	Males	65.85% (27/41)	24.39% (10/41)	2.43% (1/41)
Average	63.31% (195/308)	29.54% (91/308)	1.29% (4/308)	5.84% (18/308)

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (Foundation for Research and Innovation Support of Santa Catarina State; FAPESC – TERM OF GRANT SPONTANEOUS DEMAND – PESQUISA 2015; No.: 2015TR1543; PROCESSO No.: FAPESC1827/2015) and the Graduate Support Program by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES – Finance Code 001).

References

- [1] V.M.V. Martins, Crioulo Lageano: As qualidades de um rústico, 1st ed., Autografia, Brasil, 2021.
- [2] J. Schade, R.M. Rossi, G.V. Fontequ, E. Martins, J.A.N. Lisboa, K.K.M.C. Flaiban, M.C.P. Preti, J.H. Fontequ, Transferência de imunidade passiva e proteinograma sérico em bezerros das raças Crioula Lageana variedade Mocha e Aberdeen Angus (Red Angus) nos primeiros seis meses de vida, *Pesq. Vet. Bras.* 36 (2016) 33–40. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016001300005>.
- [3] M.D.S. Casa, G. Giovambattista, G.V. Fontequ, E.L. Miguel, C.I.G. Vogel, L.C. Miletti, S.-N. Takeshima, J.H. Fontequ, Identification of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* resistance alleles in Crioulo Lageano cattle using PCR-SBT and BoLA-DRB3 gene sequencing, *Front. Vet. Sci.* 10 (2023) 1256928. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1256928>.
- [4] FAO, Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS), Food and Agriculture Organization. (2022). [https://www.fao.org/dad-is/browse-by-country-and-species/en/\(ET02082022\)](https://www.fao.org/dad-is/browse-by-country-and-species/en/(ET02082022)).
- [5] L. Willems, A. Burny, D. Collete, O. Dangoisse, F. Dequiedt, J.S. Gatot, P. Kerkhofs, L. Lefèbvre, C. Merezak, T. Peremans, D. Portetelle, J.C. Twizere, R. Kettmann, Genetic

- Determinants of Bovine Leukemia Virus Pathogenesis, *AIDS Research and Human Retroviruses*. 16 (2000) 1787–1795. <https://doi.org/10.1089/08892220050193326>.
- [6] A. Kuczewski, K. Orsel, H.W. Barkema, S. Mason, R. Erskine, F. Van Der Meer, Invited review: Bovine leukemia virus—Transmission, control, and eradication, *Journal of Dairy Science*. 104 (2021) 6358–6375. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18925>.
- [7] T. Tsutsui, S. Kobayashi, Y. Hayama, T. Yamamoto, Fraction of bovine leukemia virus-infected dairy cattle developing enzootic bovine leukosis, *Preventive Veterinary Medicine*. 124 (2016) 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.11.019>.
- [8] A.M.M. Do Nascimento, C.M.S. De Souza, A.C.D. Oliveira, M.G. Blagitz, E.M. Ramos Sanchez, A.M.M.P. Della Libera, R.D.M.H. Leite, A.C.D.C. Fernandes, F.N. Souza, The bovine leukemia virus infection prolongs immunosuppression in dairy cows during the periparturient period by sustaining higher expression of immunological checkpoints in T cells, *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 263 (2023) 110636. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2023.110636>.
- [9] S.L. Ott, R. Johnson, S.J. Wells, Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms, *Preventive Veterinary Medicine*. 61 (2003) 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2003.08.003>.
- [10] A. Gao, V.L. Kouznetsova, I.F. Tsigelny, Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis, *Microbial Pathogenesis*. 149 (2020) 104417. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104417>.
- [11] D. Schwingel, A.P. Andreolla, L.M.S. Erpen, R. Frandoloso, L.C. Kreutz, Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil, *Sci Rep*. 9 (2019) 2949. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39834-7>.
- [12] M. Khalilian, S.M. Hosseini, O. Madadgar, Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women, *Microbial Pathogenesis*. 135 (2019) 103566. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103566>.
- [13] D.L. De Quadros, V.A. Ribeiro, M.A. Rezende, Y.A. Maté, M.A. Gomes, K. Secchi, D.M. Strottmann, R. Frandoloso, L.C. Kreutz, Oncogenic viral DNA related to human breast cancer found on cattle milk and meat, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 101 (2023) 102053. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2023.102053>.
- [14] M.P. Yamanaka, S. Saito, Y. Hara, R. Matsuura, S. Takeshima, K. Hosomichi, Y. Matsumoto, R.A. Furuta, M. Takei, Y. Aida, No evidence of bovine leukemia virus proviral DNA and antibodies in human specimens from Japan, *Retrovirology*. 19 (2022) 7. <https://doi.org/10.1186/s12977-022-00592-6>.
- [15] P.A.M. Carneiro, W.P.D. Araújo, E.H. Birgel, K.W.D. Souza, Prevalência da infecção pelo Vírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos leiteiros criados no estado do Amazonas, Brasil, *Acta Amaz.* 33 (2003) 111–125. <https://doi.org/10.1590/1809-4392200331125>.
- [16] D.S. Rajão, M.B. Heinemann, J.K.P. Reis, G.F. Braz, J.P.A. Haddad, A.C.C.L. Ribeiro, R.C. Leite, Effects of bovine leukemia virus infection on crossbred and purebred dairy cattle productive performance in Brazil, *Sem. Ci. Agr.* 35 (2014) 891. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n2p891>.
- [17] S.M. Rodakiewicz, M.L. Fernandez, M.L. Munhoz, F.H.S. Yamakawa, M. Urio, F. Forell, S. Ferraz, V.M. Portes, U.M.D. Costa, Heterogeneity determination of bovine leukemia virus genome in Santa Catarina state, Brazil, *Arq. Inst. Biol.* 85 (2018). <https://doi.org/10.1590/1808-1657000742016>.
- [18] Enzootic bovine leukosis, WOA - World Organisation for Animal Health. (n.d.). <https://www.woah.org/en/disease/enzootic-bovine-leukosis/> (accessed November 13, 2023).
- [19] OPAS - Organización Panamericana de la Salud, Bioestadística: procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo, Organización Panamericana de la Salud, Buenos Aires, 1979.

- [20] I.I. Boldrini, Flora, in: Biodiversidade Dos Campos Do Planalto Das Araucárias, Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2009: pp. 39–94.
- [21] A.S. Mariante, N. Cavalcante, Animais do Descobrimento. Raças Domésticas da História do Brasil, 2nd ed., Embrapa, Brasília, 2006.
- [22] N.C. Jain, N.C. Jain, O.W. Schalm, Essentials of veterinary hematology, 1. pr, Lea & Febiger, Philadelphia, 1993.
- [23] J. Brenner, J. Avidar, D. Iahav, . Bovine Leukemia Virus Infection Should Also Be Considered in the Differential Diagnosis of Nonspecific Clinical Manifestations, Israel Journal of Veterinary Medicine. 60 (2007) 30–31.
- [24] E. Lee, E.-J. Kim, J. Ratthanophart, R. Vitoonpong, B.-H. Kim, I.-S. Cho, J.-Y. Song, K.-K. Lee, Y.-K. Shin, Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle, Infection, Genetics and Evolution. 41 (2016) 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.04.010>.
- [25] X. Zhao, G.C. Buehring, Natural genetic variations in bovine leukemia virus envelope gene: Possible effects of selection and escape, Virology. 366 (2007) 150–165. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.03.058>.
- [26] M. Şevik, O. Avcı, Ö.B. İnce, An 8-year longitudinal sero-epidemiological study of bovine leukaemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Turkey and analysis of risk factors associated with BLV seropositivity, Trop Anim Health Prod. 47 (2015) 715–720. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0783-x>.
- [27] Y.I. Khudhair, S.A. Hasso, N.Y. Yaseen, A.M. Al-Shammari, Serological and molecular detection of bovine leukemia virus in cattle in Iraq, Emerging Microbes & Infections. 5 (2016) 1–6. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.60>.
- [28] A. Uysal, H. Yilmaz, T. Bilal, E. Berriatua, U. Bakirel, M. Arslan, M. Zerir, H. Tan, Seroprevalence of enzootic bovine leukosis in Trakya district (Marmara region) in Turkey, Preventive Veterinary Medicine. 37 (1998) 121–128. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(98\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(98)00108-1).
- [29] B. Benavides, D.A. Cedeño Quevedo, M.F.S. De La Cruz, . Epidemiological study of bovine leukemia virus in dairy cows in six herds in the municipality of Pasto, Nariño, Revista Lasallista de Investigación. 10 (2013) 18–23.
- [30] F.V. Bauermann, J.F. Ridpath, D.A. Dargatz, Bovine leukemia virus seroprevalence among cattle presented for slaughter in the United States, J VET Diagn Invest. 29 (2017) 704–706. <https://doi.org/10.1177/1040638717702183>.
- [31] Z. Nava, C. Obando, M. Molina, M. Bracamonte, O. Tkachuk, Seroprevalence of Enzootic Bovine Leukosis and its Association with Clinical Signs and Risk Factors in Dairy Herds from Barinas State, Venezuela, Revista de La Facultad de Ciencias Veterinarias. 52 (2011) 13–23.
- [32] H. Morovati, E. Shirvani, V. Noaman, M. Lotfi, M. Kamalzadeh, A. Hatami, M. Bahreyari, Z. Shahramyar, M.H. Morovati, M. Azimi, D. Sakhaei, Seroprevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Isfahan Province, Iran, Trop Anim Health Prod. 44 (2012) 1127–1129. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0062-4>.
- [33] R.S. Juliano, M.C.S. Fioravanti, W.M.E.D.D. Brito, U.G.P.D. Abreu, S.N.D. Souza, Soroepidemiologia da leucemia bovina (LB) em bovinos curraleiros dos estados de Goiás e Tocantins, Brasil, Ciênc. Anim. Bras. 15 (2014) 289–295. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v15i313369>.
- [34] D. Hernandez, J. Muñoz, L. Álvarez, Dinámica de la Leucosis Bovina en el ganado criollo Hartón del Valle en infección natural, ARCH ZOOTECH. 65 (2016) 365. <https://doi.org/10.21071/az.v65i251.698>.

- [35] M. Polat, H.H. Moe, T. Shimogiri, K.K. Moe, S. Takeshima, Y. Aida, The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle, *Arch Virol.* 162 (2017) 425–437. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3118-y>.
- [36] N. Gillet, A. Florins, M. Boxus, C. Burteau, A. Nigro, F. Vandermeers, H. Balon, A.-B. Bouzar, J. Defoiche, A. Burny, M. Reichert, R. Kettmann, L. Willems, Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human, *Retrovirology.* 4 (2007) 18. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>.
- [37] N.G. Porta, G. Suarez-Archilla, C. Miotti, A.I. Molineri, I. Alvarez, K. Trono, M. Signorini, V. Ruiz, Seroprevalence and risk factors associated with bovine Leukemia virus infection in argentine beef cattle, *Research in Veterinary Science.* 164 (2023) 104999. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2023.104999>.
- [38] T.R. Spinola, H.G. Bertagnon, C.F. Batista, F.N. Souza, M.R. Azedo, M.G. Blagitz, F.J. Benesi, A.M.M.P.D. Libera, Correlação entre a atipia linfocitária e o perfil imunológico de vacas leiteiras infectadas pelo vírus da leucemia bovina, *Sem. Ci. Agr.* 34 (2013) 293–300. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n1p293>.
- [39] O. Nekouei, J. VanLeeuwen, H. Stryhn, D. Kelton, G. Keefe, Lifetime effects of infection with bovine leukemia virus on longevity and milk production of dairy cows, *Preventive Veterinary Medicine.* 133 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.09.011>.

6. ARTIGO 2

GENETIC GUARDIANS: THE DRB3*1201 ALLELE AND SELECTIVE BREEDING STRATEGIES FOR BOVINE ENZOOTIC LEUKOSIS CONTROL

Graziela Vieira Fontequê^{1,2}, Mariana da Silva Casa¹, Zigomar da Silva³, Carla Ivane Ganz Vogel⁴, Joandes Henrique Fontequê⁴, Ubirajara Maciel da Costa⁴, Guillermo Giovambattista⁵, Shin-Nosuke Takeshima⁶, Luiz Claudio Milleti^{4*}

¹- Graduate Program in Animal Science (PPGCA), State University of Santa Catarina (UDESC), Lages, Brazil.

²- Centro Universitario UNIFACVEST: Lages, SC, BR

³- Department of Animal Science, McGill University, Sainte-Anne-de-Bellevue, QC, Canada.

⁴- Department of Veterinary Medicine, State University of Santa Catarina (UDESC), Lages, Brazil.

⁵- IGEVET – Institute of Veterinary Genetics (UNLP-CONICET LA PLATA), Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP, La Plata, Argentina.

⁶- Department of Food and Nutrition, Faculty of Human Life, Jumonji University, 2-1-28 Sugawara, Niiza, Saitama, Japan.

* **Correspondence:** gvieirafontequê@gmail.com

Abstract

Molecular understanding of bovine leukosis virus (BLV) infection in Crioula Lageano cattle, identification of 41 alleles, exhibited high genetic variability and the association of BoLA-DRB3*1201 with resistance provide valuable perspectives. The absence of alleles linked to susceptibility highlights the potential for selective breeding to enhance resistance, crucial considerations for disease control of genetics in enzootic bovine leukosis (EBL) resistance and its potential implications for public health. DNA was extracted from 208 Crioula Lageano bovine blood samples, spanning various ages, categories, and both sexes. The PCR technique targeted the 440bp fragment of the env gene of the BLV and 284bp for the alleles BoLA-DRB3 gene. Subsequent Sanger sequencing aimed for precise allele identification. Using the direct counting method, allele frequency and the number of this alleles were determined. The DRB3*1201 allele displayed association with resistance to BLV infection ($p = 0.035$, O.R. =

0.000). The association between genetic variability and disease incidence underscores the importance of genetic considerations in formulating management and control strategies for EBL in diverse cattle populations, with potential implications for food safety and public health.

Keywords: resistance alleles, genotyping, creole breed, veterinary genetics, bovine enzootic leukosis, PCR.

Introduction

The appropriate use of genetic resources is crucial to guarantee food security and production committed to social and environmental sustainability. Concerning livestock, locally adapted breeds are known for presenting high genetic variability achieved due to the constant challenges imposed by the environment (Fioravanti et al., 2020). The Crioula Lageana breed is locally existing from the Serrano Plateau of the state of Santa Catarina (Brazil). The breed is well known for its rusticity, high productivity and genetic variability (Martins, 2021). The challenges faced by this breed along its formation and existence include the severe climate and infectious diseases caused by different etiological agents (Mariane, 2005; Casa, 2023).

Enzootic bovine leukosis (EBL) is an infectious and contagious disease, cosmopolitan in nature, caused by the bovine leukosis virus (BLV), a natural viral infection for bovine is an important disease, causes a persistent infection of B-lymphocytes, compromising the immunological response and causing severe economic losses in the cattle industry (Kuczewski et al., 2021). EBL can be transmitted in different ways, including horizontal transmission, animal-to-animal contact, iatrogenic and many others. To control and avoid the spread of the disease, are needed several approaches. Since there is no cure or vaccine commercially available to date identification and segregation of positive animals is one of the most used measures to create an EBL-free herd of positive and negative animals to create an EBL-free herd (Gillet et al., 2007; WOAH, 2018; Ramalho et al., 2020;).

However, despite the effectiveness of the identification and segregation method, this is only possible after infection occurs, not impending economic losses. Alternative to this is the identification of polymorphisms in genes that confer resistance to BLV infection and then, selecting the animals carrying the resistance-associated alleles (Bishop and Woolliams, 2014). The Bovine Leukocytes Antigens class II, DRB3 (BoLA-DRB3) gene encodes the β chain of MHC class II molecules, expressed in antigen-presenting cells (Brujeni et al., 2016). BoLA-DRB3 has been associated with resistance to several infectious diseases including mastitis

(Pokorska et al., 2018), foot and mouth disease (Lei et al., 2012), anaplasmosis and babesiosis (Casa et al., 2023) and EBL/BLV (Lo et al., 2020;Lo et al., 2021).

The occurrence of resistance alleles in locally adapted breeds is very well reported and is important to the preservation of breeds because these breeds represent a reservoir for genes that could be used in genetic selection or gene transfer programs through gene editing tools. On this hand, this study aimed to determine the presence of BoLA-DRB3 alleles associated with resistance or susceptibility to BLV infection in Crioula Lageano cattle.

Material and Methods

Animals, samples, and ethical aspects

DNA was extracted from 208 Crioula Lageana bovine blood samples, of different ages, categories (bull, cows, heifers, and calves) and both sexes. These samples were obtained from *in situ* breeding properties in the mountainous region of Santa Catarina, southern Brazil, where the animals face similar climatic and grazing conditions. A breed that originated from *Bos taurus* strains, it stands out for its high and robust meat quality, exhibiting remarkable adaptability to challenging environments (Martins et al., 2021). This study was approved by Ethics Committee on the Use of Animals of Santa Catharina State University (CEUA/UDESC) (protocol nº 2461171115).

Molecular analyses

DNA extraction

DNA extraction was done using the ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (PROMEGA®) kit, according to manufacturer instructions.

PCR – BLV

The PCR technique was used to amplify the 440bp fragment of the env gene of the enzootic bovine leukosis virus. The PCR reaction took place in 0.2mL microtubes, where a final volume of 25µL of solution was added, containing 1U of Taq Polymerase enzyme GoTaq® Hot Start Polymerase, (Promega); 8.5 pmoles of each primer: OBLV1A (5'CTT TGT GTG CCA AGT CTC CCA GAT ACA3') and OBLV6A (5'CCA ACA TAT AGC ACA GTC TGG GAA GGC3'), 0.2mM of nucleotides (dNTPs); 3.5mM magnesium chloride; 5µL of 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega); 3µL of DNA (concentration between 20 and 100ng/µL) and

ultra-pure water to complete the volume. Positive and negative controls were used for each reaction, the latter being used to guarantee the quality and specificity of the technique, addressing the same parameters mentioned above, only replacing the use of genomic DNA with ultra-pure, DNase-free water.

The temperature conditions applied in the thermocycler (Biocycler®) were: 94°C for five minutes, followed by five cycles of 94°C for 45 seconds, 60°C for 1 minute and 72°C for 90 seconds, followed by 35 cycles of 94°C for 45 seconds, 59°C for 60 seconds 72°C for 90 seconds, and the last final extension cycle at 72°C for 7 minutes.

Electrophoresis of the amplification products was carried out in a horizontal tank, in a 2% agarose gel added with Unisafe Dye 20,000x (Uniscience). In the first gap of the gel, a 100bp molecular weight marker was used as a standard to determine the size of the sample bands. The electrical source conditions were 140 Volts and 400mA for 1h00min, and visualization through exposure to ultraviolet light. Bands with a size close to 440bp were considered positive for the EBL virus.

BoLA-DRB-3.2 genotyping

Amplification of the BoLA-DRB3 gene was carried out using the single-step PCR technique, with the primers HLO30 (5'-ATC CTC TCT CTG CAG CAC ATT TCC-3') and HLO32 (5'-TCG CCG CTG CAC AGT GAA ACT CTC-3') (DUANGJINDA et al., 2013).

The reaction conditions were initial denaturation at 95°C for five minutes, followed by 35 cycles of 95°C for 1 minute, 65°C for 1 minute and 72°C for 1 minute and a final extension at 72°C for 10 minutes. Electrophoresis of the amplification products was carried out in a horizontal tank, in a 1.5% agarose gel added with Unisafe Dye 20,000x (Uniscience).

Used as a standard to determine the size of the sample bands, a 100 base pair (bp) molecular weight marker was employed. The electrical source operated for 40 minutes at 100 V and 400 mA, with visualization achieved through exposure to ultraviolet light. From exon 2 of the BoLA-DRB3 gene, a fragment of 284 bp was obtained.

Sent to a specialized company (ACTGene – Rio Grande do Sul, Brazil) for sequencing by the Sanger method, the products of this PCR reaction aimed at the precise identification of alleles.

Analyzed using Assign 400ATF ver. 1.0.2.41 software (Conexio Genomics, Fremantle, Australia), as outlined by Takeshima et al. (2011), the raw sequence data were also cross-referenced with a database containing all BoLA-DRB3 alleles documented in the IPD-MHC

(<https://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/>). Leveraging this information, the software identified the genotype that explains the multiple polymorphic sites within the BoLA-DRB3 second exon.

Statistical analysis

The direct counting method was employed to obtain allele frequency and the number of alleles for the BoLA-DRB3 gene. Positive and negative groups were formed during the association analysis, with the consideration that all animals were equally exposed. Subsequently, the chi-square test ($p < 0.05$) was utilized to determine the association between each allele and infection by EBL. This was followed by odds ratio analysis using the SigmaPlot12 software (SigmaPlot version 12.0 for Windows, Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Alleles with an odds ratio (OR) less than 1 were classified as resistance alleles, whereas those with an OR greater than 1 were deemed susceptibility alleles.

Results

The examination of the 208 animals clinically revealed that Crioulo Lageano did not exhibit clinical signs consistent with EBL, but the molecular diagnosis out shows the proportions of infection occurrence of 38% (80/208) BLV prevalence.

A high genetic variability for the BoLA-DRB3 gene was shown in the Crioula Lageana breed, with 41 alleles found through DNA sequencing. (Table 1). Among all the alleles evaluated, the DRB3*1201 allele presented a p value = 0.035 and O.R. = 0.000 which means an association with the resistance to the BLV infection. The allele was found in 7 different animals, being 5 heifers, 1 cow and 1 male calf, all of them were heterozygous, which means an allelic frequency of 1.68% (7/416). None of the alleles was associated with susceptibility to BLV infection.

Table 1 - Chi-square (X^2) and Odds ratio analysis between BoLA-DRB3 alleles and presence/absence of the BLV in the PCR, to determine resistance/susceptibility alleles in the Crioulo Lageano cattle.

Alelo BoLA-DRB3	<i>Ho</i>		<i>He</i>		<i>P Value</i>	O.R.
	BLV + (160)	BLV – (256)	BLV +	BLV		
<i>DRB3*0101</i>	15	18	13	20	0,389	1,333
<i>DRB3*0201</i>	09	08	07	10	0,210	1,800

<i>DRB3*0501</i>	06	17	09	14	0,209	0,565
<i>DRB3*0503</i>	00	01	00	01	0,429	0,000
<i>DRB3*0701</i>	06	10	06	10	0,936	0,960
<i>DRB3*0801</i>	00	03	01	02	0,169	0,000
<i>DRB3*0802</i>	01	00	00	01	0,205	0,000
<i>DRB3*0901</i>	02	02	02	02	0,634	1,600
<i>DRB3*0902</i>	03	02	02	03	0,319	2,400
<i>DRB3*1101</i>	09	16	10	15	0,794	0,900
<i>DRB3*1201</i>	00	07	03	04	0,035	0,000
<i>DRB3*1501</i>	05	18	09	14	0,090	0,444
<i>DRB3*1506</i>	00	01	00	01	0,429	0,000
<i>DRB3*1601</i>	07	14	08	13	0,620	0,800
<i>DRB3*1701</i>	04	07	04	07	0,885	0,914
<i>DRB3*1703</i>	02	00	01	01	0,073	0,000
<i>DRB3*1801</i>	20	26	18	28	0,458	1,231
<i>DRB3*1804</i>	00	02	01	01	0,262	0,000
<i>DRB3*2002</i>	01	00	00	01	0,205	0,000
<i>DRB3*2003</i>	00	02	01	01	0,262	0,000
<i>DRB3*2101</i>	02	00	01	01	0,073	0,000
<i>DRB3*2201</i>	14	25	15	24	0,730	0,896
<i>DRB3*2212</i>	01	01	01	01	0,737	1,600
<i>DRB3*2214</i>	00	01	00	01	0,429	0,000
<i>DRB3*2406</i>	00	03	01	02	0,169	0,000
<i>DRB3*2601</i>	08	07	06	09	0,228	1,829
<i>DRB3*2606</i>	00	01	00	01	0,429	0,000
<i>DRB3*2705</i>	00	03	01	02	0,169	0,000
<i>DRB3*2801</i>	17	21	15	23	0,404	1,295
<i>DRB3*2802</i>	02	00	01	01	0,073	0,000
<i>DRB3*3101</i>	02	00	01	01	0,073	0,000
<i>DRB3*3201</i>	03	01	02	02	0,131	4,800
<i>DRB3*3701</i>	02	03	02	03	0,943	1,067
<i>DRB3*4401</i>	06	10	06	10	0,936	0,960
<i>DRB3*5701</i>	02	00	01	01	0,073	0,000
<i>DRB3*5702</i>	06	16	08	14	0,268	0,600
<i>DRB3*10001</i>	02	01	01	02	0,314	3,200

<i>DRB3*140101</i>	01	06	03	04	0,185	0,267
<i>DRB3*200101</i>	00	02	01	01	0,262	0,000
<i>DRB3*250101</i>	02	00	01	01	0,073	0,000
<i>DRB3*020101</i>	00	01	00	01	0,429	0,000

The *DRB3*1201* allele, identified in seven animals, showed heterozygosity, indicating an allelic frequency of 1.68%. None of the alleles were associated with susceptibility to BLV infection. Crioula Lageana breed revealed a occurrence of 38% (80/208) for EBL, contrasting with the regional average of 68%. This marked difference suggests a significant role of genetic factors, particularly resistance alleles found in the Crioula Lageana breed (Table 2).

Table 2 – Animals according to category identified with the *BoLA-DRB3*1201* allele, associated with resistance to enzootic bovine leukosis (ELB) in the Crioulo Lageano cattle.

Categories	Alleles	Alleles
Calve	<i>DRB3*1201</i>	<i>DRB3*1801</i>
Heifer	<i>DRB3*0201</i>	<i>DRB3*1201</i>
Heifer	<i>DRB3*2201</i>	<i>DRB3*1201</i>
Heifer	<i>DRB3*0201</i>	<i>DRB3*1201</i>
Heifer	<i>DRB3*1201</i>	<i>DRB3*1501</i>
Heifer	<i>DRB3*1201</i>	<i>DRB3*1701</i>
Cow	<i>DRB3*1201</i>	<i>DRB3*1701</i>

Discussion

This research marks the pioneering analysis of the association between *BoLA-DRB3* alleles and natural Leukosis infection in the Crioulo Lageano breed. Understanding resistance genes, along with effective control and prophylaxis programs, is essential for eradicating BLV in herds. These factors also play a crucial role as significant allies in public health efforts.

A resistance exhibited by certain cattle to BLV is believed to be associated with host characteristics linked to the Major Histocompatibility Complex (MHC) (Brujeni et al., 2016). The consistent findings across various studies, including our own, emphasize the genetic underpinnings of resistance to BLV.

The identification of the *BoLA-DRB3* gene on chromosome 23, as observed by Aida et al. (2011), suggests a potential linkage to the development of BLV induced EBL. This insight was gained through the utilization of monoclonal antibody markers (Mab) c143 in conjunction with microsatellite markers in cattle with lymphoma and asymptomatic individuals.

BoLA genes are extensively utilized as markers for diseases and immunological traits in cattle. In the context of BLV beyond diagnosis, the proviral load plays a crucial role in assessing disease progression and transmission risk. Takeshima et al. (2019) investigated the frequency of BoLA-DRB3, BoLA-DQA1 alleles, and MHC class II haplotypes in Holstein cows in Japan. They concluded that viral load is strongly associated with the polymorphism of these alleles. These results have the potential utility in identifying and eliminating cows carrying BLV, eliminating the need for segregation into positive and negative batches.

Understanding resistance genes, coupled with effective control and prophylaxis programs, emerges as a crucial component in eradicating BLV in herds. This not only aids in disease management but also serves as a significant ally in public health efforts. The potential utility of genetic markers, as demonstrated by Takeshima et al., (2019), can streamline identification and elimination strategies, eliminating the need for segregation into positive and negative batches.

Resistance alleles of the BoLA DRB3.2 gene (*1101, *2709, and *20012) were observed at a higher frequency in Colombian Criollo cattle compared to susceptibility alleles. This observation indicates a low incidence of Bovine Leukosis (BL) within the breed, despite the high prevalence of the disease in the country (HERNÁNDEZ et al., 2011).

Polymorphism of the DRB3 gene was investigated and associated with BLV in Colombian Criollo cattle. Alleles *1101 and *2703 were identified and positively linked to reduced viral infection, low development of lymphocytosis, increased antibodies against leukemia, and decreased proviral load. As a result, these animals were classified as resistant to the development and/or progression of the disease (HERNÁNDEZ et al., 2014).

The polymorphism analysis in Colombian Criollo cattle by Hernández et al. (2014) and Hernández et al. (2011) offers additional context. The higher frequency of resistance alleles (*1101, *2703, and *20012) in Colombian Criollo cattle suggests a lower incidence of Bovine Leukosis within the breed, despite the high prevalence of the disease in the country.

The discovery becomes particularly intriguing when compared with data obtained from our previous study involving the Crioula Lageana breed. Our results indicate an occurrence of 38% (80/208) for EBL, while the average in the Serrana region, where the properties were studied, is 68%. This marked discrepancy between the average prevalence in the region and within the Crioula Lageana breed strongly suggests that genetic factors, exemplified by the resistance alleles identified in Colombian Criollo cattle, may play a significant role in the lower incidence of BL in this specific breed. This association between genetic variability and disease

incidence underscores the importance of genetic considerations when assessing and developing management and control strategies for Bovine Leukosis in different cattle populations.

The characterization of the bovine Major Histocompatibility Complex (MHC) diversity in Criollo cattle breeds of Latin America, through BoLA-DRB3.2 sequencing, revealed high genetic diversity. This diversity, attributed to the multiple origins of Criollo germplasm (European, African, and Indian), has the potential to be maintained in a balanced manner through selection (GIOVAMBATTISTA et al., 2013). Comparing these findings with the observed high genetic variability in Crioula Lageano cattle in our study emphasizes similarities, suggesting the presence of diverse germplasm elements, possibly of European, African, and Indian origins. This similarity underscores the importance of preserving this diversity in a balanced way through selection strategies, which can have significant implications for genetic resistance to diseases and overall health in these Criollo breeds. Establishing connections between MHC genetic variability in Latin American Criollos and Crioula Lageano cattle can enhance the understanding of the genetic foundations of these populations.

Our study contributes to the molecular understanding of BLV infection within Crioulo Lageano cattle. The identification of 41 alleles for the BoLA-DRB3 gene, with the DRB3*1201 allele showing a significant association with resistance, provide valuable perspectives into the genetic diversity of this breed. Furthermore, the absence of alleles associated with susceptibility underscores the potential for selective breeding to enhance resistance.

These collective findings have practical implications for disease control strategies. The genetic markers identified present opportunities for selective breeding programs aimed at enhancing resistance within cattle populations. Such targeted genetic interventions could prove instrumental in reducing the prevalence and impact of BLV, ultimately contributing to the overall health and sustainability of cattle herds.

The pronounced presence of BLV DNA in cancerous mammary tissue, surpassing rates in healthy tissue, has been identified in humans in recent studies (Giovanna et al., 2013; Buehring et al., 2014; Baltzell et al., 2018; Schwingel et al., 2019; Gao et al., 2020) and human blood (Buehring et al., 2019). Given this, the significance of our study becomes apparent, as it not only contributes to the comprehension of BLV in cattle but also proposes substantial consequences for human health, considering the plausible zoonotic dimension. Emphasizing the potential repercussion of BLV on public health, our findings underscore the pivotal

importance of investigations that establish correlations between bovine health and overall well-being.

A valuable suggestion for future research would be to conduct additional studies involving the specific testing of these alleles under artificial infection conditions. These experiments would allow for a more precise and detailed analysis of the immune response associated with BoLA-DRB3 in cattle exposed to BLV. Through the development of cells with known resistant genotypes, aiming to deepen our understanding of the molecular mechanisms underlying resistance to infection, disease progression, and the development of specific immunological strategies. Such studies are crucial for advancing our understanding and establishing a solid foundation for future interventions and management strategies in preventing EBL.

Conclusion

The identification of the allele BoLA-DRB3*1201, associated with resistance to EBL infection and presence of 41 alleles for the BoLA-DRB3 gene in Crioulo Lageano cattle, suggests a genetic diversity that can be harnessed through selective breeding programs to promote more resistant animals.

Our findings not only contribute to the molecular understanding of BLV infection in Crioulo Lageano cattle but also provide valuable perspectives for disease control strategies, highlighting the significance of genetics in resistance to EBL and its potential implications for public health and food security.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions

Conceptualization and design of the study: GVF and LCM. Data acquisition: GVF, MSC. Data analysis and interpretation: GVF and ZS. Drafting the manuscript: GVF and ZS. Article revision and corrections: GVF, ZS, JF, LCM. All authors read and approved the final version of the manuscript to be submitted.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (Foundation for Research and Innovation Support of Santa Catarina State; FAPESC – TERM OF GRANT SPONTANEOUS DEMAND – PESQUISA 2015; No.: 2015TR1543; PROCESSO No.: FAPESC1827/2015) and the Graduate Support Program by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES – Finance Code 001).

Acknowledgments

The authors thank the Crioulo Lageano raisers for allowing access to the herds for blood sample collection.

References

- Fioravanti MCS, Freitas TMS, Moura MI, Costa GL, Dias JM, Guimarães LKP, Gómez MM, Landi V. Resistencia y resiliencia a las enfermedades en las razas de rumiantes locales: un enfoque en América del Sur. *Archivos de Zootecnia* (2020) 69:338–352. doi: 10.21071/az.v69i267.5353
- Martins VMV. *Crioulo Lageano: As qualidades de um rústico*. 1st ed. Brasil: Autografia (2021).
- Casa MDS, Giovambattista G, Fontequ GV, Miguel EL, Vogel CIG, Milette LC, Takeshima S-N, Fontequ JH. Identification of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* resistance alleles in Crioulo Lageano cattle using PCR-SBT and BoLA-DRB3 gene sequencing. *Front Vet Sci* (2023) 10:1256928. doi: 10.3389/fvets.2023.1256928
- Mariante A da S, Albuquerque M do SM, Egito AA, Paiva SR, Castro STR. Conservação de raças brasileiras ameaçadas de extinção e a importância de sua inserção em sistemas de produção. *Agrociencia* (2005) 9:459–464.

Kuczewski A, Orsel K, Barkema HW, Mason S, Erskine R, Van Der Meer F. Invited review: Bovine leukemia virus—Transmission, control, and eradication. *Journal of Dairy Science* (2021) 104:6358–6375. doi: 10.3168/jds.2020-18925

Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar A-B, Defoiche J, Burny A, et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology* (2007) 4:18. doi: 10.1186/1742-4690-4-18

World Animal Health Information System WAHIS. WOA - World Organisation for Animal Health <https://www.woah.org/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/disease-data-collection/world-animal-health-information-system/> [Accessed November 13, 2023]

Ramalho GC, Limeira CH, Falcão BMR, Nogueira DB, Costa FTRD, Bezerra CDS, Silva MLCR, Martins CM, Alves CJ, Santos CDSAB, et al. Seroprevalence of enzootic bovine leukosis (EBL): a systematic review and meta-analysis. *RSD* (2020) 9:e43591211228. doi: 10.33448/rsd-v9i12.11228

Bishop SC, Woolliams JA. Genomics and disease resistance studies in livestock. *Livestock Science* (2014) 166:190–198. doi: 10.1016/j.livsci.2014.04.034

Brujeni GN, Ghorbanpour R, Esmailnejad A. Association of BoLA-DRB3.2 Alleles with BLV Infection Profiles (Persistent Lymphocytosis/Lymphosarcoma) and Lymphocyte Subsets in Iranian Holstein Cattle. *Biochem Genet* (2016) 54:194–207. doi: 10.1007/s10528-016-9712-6

Pokorska J, Kułaj D, Dusza M, Ochrem A, Makulska J. The influence of BoLA-DRB3 alleles on incidence of clinical mastitis, cystic ovary disease and milk traits in Holstein Friesian cattle. *Mol Biol Rep* (2018) 45:917–923. doi: 10.1007/s11033-018-4238-0

Lei W, Liang Q, Jing L, Wang C, Wu X, He H. BoLA-DRB3 gene polymorphism and FMD resistance or susceptibility in Wanbei cattle. *Mol Biol Rep* (2012) 39:9203–9209. doi: 10.1007/s11033-012-1793-7

Lo C-W, Borjigin L, Saito S, Fukunaga K, Saitou E, Okazaki K, Mizutani T, Wada S, Takeshima S, Aida Y. BoLA-DRB3 Polymorphism is Associated with Differential Susceptibility to Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma and Proviral Load. *Viruses* (2020) 12:352. doi: 10.3390/v12030352

Lo C-W, Takeshima S, Okada K, Saitou E, Fujita T, Matsumoto Y, Wada S, Inoko H, Aida Y. Association of Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma with BoLA-DRB3 Polymorphisms at DNA, Amino Acid, and Binding Pocket Property Levels. *Pathogens* (2021) 10:437. doi: 10.3390/pathogens10040437

Duangjinda M, Jindatajak Y, Tipvong W, Sriwarothai J, Pattarajinda V, Katawatin S, Boonkum W. Association of BoLA-DRB3 alleles with tick-borne disease tolerance in dairy cattle in a tropical environment. *Veterinary Parasitology* (2013) 196:314–320. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.03.005

Takeshima S -N., Matsumoto Y, Miyasaka T, Arainga-Ramirez M, Saito H, Onuma M, Aida Y. A new method for typing bovine major histocompatibility complex class II DRB3 alleles by combining two established PCR sequence-based techniques. *Tissue Antigens* (2011) 78:208–213. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01708.x

Aida Y, Takeshima S, Matsumoto Y, Miyasaka T, Miyazaki Y, Tanabe Y, Davis WC, Okada K. Bovine MHC class II DR molecule plays a key role in bovine leukemia virus (BLV)-induced lymphoma. *Retrovirology* (2011) 8:A7, 1742-4690-8-S1-A7. doi: 10.1186/1742-4690-8-S1-A7.

Takeshima S, Ohno A, Aida Y. Bovine leukemia virus proviral load is more strongly associated with bovine major histocompatibility complex class II DRB3 polymorphism than with DQA1 polymorphism in Holstein cow in Japan. *Retrovirology* (2019) 16:14. doi: 10.1186/s12977-019-0476-z

Hernández DY, Álvarez LA, Muñoz JE. Evaluation Of Genetic Resistance of Creole Cattle Hartón Del Valle To Bovine Leukosis Virus In Natural Infection. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal* (2014) 4:3–5.

Hernández DY, Muñoz JE, Álvarez LA. Asociación del locus BOLA-DRB3.2 con el virus de la leucosis bovina en el ganado criollo colombiano. *Rev Colombiana Cienc Anim* (2014) 6:319. doi: 10.24188/recia.v6.n2.2014.435

Giovambattista G, Takeshima S, Ripoli MV, Matsumoto Y, Franco LAA, Saito H, Onuma M, Aida Y. Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in Latin American Creole cattle breeds. *Gene* (2013) 519:150–158. doi: 10.1016/j.gene.2013.01.002

Giovanna M, Carlos UJ, María UA, Gutierrez MF. Bovine Leukemia Virus Gene Segment Detected in Human Breast Tissue. *Open Journal of Medical Microbiology* (2013) 3:84–90. doi: 10.4236/ojmm.2013.31013

Buehring GC, DeLaney A, Shen H, Chu DL, Razavian N, Schwartz DA, Demkovich ZR, Bates MN. Bovine leukemia virus discovered in human blood. *BMC Infect Dis* (2019) 19:297. doi: 10.1186/s12879-019-3891-9

Baltzell KA, Shen HM, Krishnamurthy S, Sison JD, Nuovo GJ, Buehring GC. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas. *Cancer* (2018) 124:1342–1349. doi: 10.1002/cncr.31169

Schwingel D, Andreolla AP, Erpen LMS, Frandoloso R, Kreutz LC. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. *Sci Rep* (2019) 9:2949. doi: 10.1038/s41598-019-39834-7

Gao A, Kouznetsova VL, Tsigelny IF. Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis. *Microbial Pathogenesis* (2020) 149:104417. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104417

Miller JM, Miller LD, Olson C, Gillette KG. Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J Natl Cancer Inst* (1969) 43:1297–1305.

Paul PS, Pomeroy KA, Johnson DW, Muscoplat CC, Handwerger BS, Soper FF, Sorensen DK. Evidence for the replication of bovine leukemia virus in the B lymphocytes. *Am J Vet Res* (1977) 38:873–876.

CONCLUSÃO

A prevalência de leucose enzootica bovina (LEB) na raça Crioula Lageana foi de 6,82% (21/308) para o teste ELISA e 36,69% (113/308) para a PCR. O alelo DRB3*1201 apresentou associação com resistência à infecção natural pelo BLV.

Concluimos que o BLV está presente em bovinos Crioula Lageana, sendo necessário o estabelecimento de medidas de prevenção e controle para evitar a propagação da doença dentro do rebanho. O alelo DRB3*1201 pode ser utilizado nos programa de seleção e melhoramento para selecionar animais resistentes ao BLV.

REFERÊNCIAS

- AIDA, Y. et al. Bovine MHC class II DR molecule plays a key role in bovine leukemia virus (BLV)-induced lymphoma. **Retrovirology**, v. 8, p. 1-1, 2011.
- AMILLS, M. et al. The major histocompatibility complex of ruminants. **Rev Sci Tech**, v. 17, n. 1, p. 108-20, Apr 1998. ISSN 0253-1933 (Print)
0253-1933.
- AMORIL, J. et al. Seroprevalence and risk factors for bovine leukemia virus infection in cattle of Goiás, Brazil. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 1, n. 128, p. 333-334, 2009. ISSN 0165-2427.
- ANDERSSON, L. Major histocompatibility genes in cattle and their significance for immune response and disease susceptibility. **Major histocompatibility genes in cattle and their significance for immune response and disease susceptibility**, p. 213-226, 1990. ISSN 3527280979.
- ANDERSSON, L. et al. Linkage relationships in the bovine MHC region. High recombination frequency between class II subregions. **Immunogenetics**, v. 27, n. 4, p. 273-80, 1988. ISSN 0093-7711 (Print)
0093-7711.
- BALTZELL, K. A. et al. Bovine leukemia virus linked to breast cancer but not coinfection with human papillomavirus: Case-control study of women in Texas. **Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1342-1349, 2018. ISSN 0008-543X.
- BATHO, H. et al. The EU veterinarian. **European Commission. Available online: http://ec.europa.eu/food/resources/the_eu_veterinarian_080410.pdf**, 2008.
- BAUERMAN, F. V.; RIDPATH, J. F.; DARGATZ, D. A. Bovine leukemia virus seroprevalence among cattle presented for slaughter in the United States. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 5, p. 704-706, 2017. Available at: < <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1040638717702183> >.
- BENAVIDES BENAVIDES, B.; CEDEÑO QUEVEDO, D. A.; SERRANO DE LA CRUZ, M. F. Epidemiological study of bovine leukemia virus in dairy cows in six herds in the municipality of Pasto, Nariño. **Revista lasallista de investigación**, v. 10, n. 1, p. 18-23, 2013. ISSN 1794-4449.
- 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. 1335-1340, 2019.

BENSAID, A. et al. Identification of expressed bovine class I MHC genes at two loci and demonstration of physical linkage. **Immunogenetics**, v. 33, n. 4, p. 247-54, 1991. ISSN 0093-7711 (Print)

0093-7711.

BEYER, J. et al. Cattle Infected with Bovine Leukaemia Virus may not only Develop Persistent B-cell Lymphocytosis but also Persistent B-cell Lymphopenia. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 49, n. 6, p. 270-277, 2002. ISSN 0931-1793.

BIANCHINI, E. et al. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, p. 1443-1448, 2006. ISSN 0100-204X.

BISHOP, S. C.; WOOLLIAMS, J. A. Genomics and disease resistance studies in livestock. **Livest Sci**, v. 166, p. 190-198, Aug 2014. ISSN 1871-1413 (Print)

1871-1413.

BRENNER, J.; AVIDER, J.; IAHAV, D. BOVINE LEUKEMIA VIRUS INFECTION SHOULD ALSO BE CONSIDERED IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF NONSPECIFIC CLINICAL MANIFESTATIONS. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 62, n. 1, p. 30, 2007. ISSN 0334-9152.

BRENNER, J. et al. The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 22, n. 3, p. 299-305, 1989/10/01/ 1989. ISSN 0165-2427. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165242789900172> >.

BRUJENI, G. N.; GHORBANPOUR, R.; ESMAILNEJAD, A. Association of BoLA-DRB3. 2 alleles with BLV infection profiles (persistent lymphocytosis/lymphosarcoma) and lymphocyte subsets in Iranian Holstein cattle. **Biochemical genetics**, v. 54, p. 194-207, 2016. ISSN 0006-2928.

BUEHRING, G. C.; PHILPOTT, S. M.; CHOI, K. Y. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. **AIDS research and human retroviruses**, v. 19, n. 12, p. 1105-1113, 2003. ISSN 0889-2229.

BUEHRING, G. C. et al. Bovine leukemia virus DNA in human breast tissue. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 5, p. 772, 2014.

BUEHRING, G. C. et al. Exposure to bovine leukemia virus is associated with breast cancer: a case-control study. **PloS one**, v. 10, n. 9, p. e0134304, 2015. ISSN 1932-6203.

CARDOSO, C. P. et al. Resistance against gastrointestinal nematodes in Crioulo Lageano and crossbred Angus cattle in southern Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 183-191, 2013. ISSN 0304-4017.

CARNEIRO, P. A. M. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 111-125, 2003. ISSN 0044-5967.

CASA, M. D. S. et al. Identification of Anaplasma Marginale, Babesia Bovis and Babesia bigemina Resistance Alleles in Crioulo Lageano Cattle Using PCR-SBT And BoLA-DRB3 Gene Sequencing. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 10, p. 1256928, 2023. ISSN 2297-1769.

CHAVES, N. P. et al. Intercurrence of enzootic leucosis and brucellosis in buffaloes (Bubalus bubalis) in extensive production system. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 131-134, 2012. ISSN 0100-736X.

DA MOTA, A. et al. Distribution of bovine lymphocyte antigen (BoLA-DRB3) alleles in Brazilian dairy Gir cattle (Bos indicus). **European Journal of Immunogenetics**, v. 29, n. 3, p. 223-227, 2002. ISSN 0960-7420.

DE BARROS FILHO, I. et al. Soroprevalência de anticorpos para o vírus da leucose enzoótica em bovinos criados na região metropolitana de Curitiba, Paraná. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 511-515, 2020. ISSN 0020-3653.

DE MATOS, P. F.; JÚNIOR, E. H. B.; BIRGEL, E. H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre os resultados do teste de ELISA e da imunodifusão em gel de ágar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 3, p. 171-180, 2005. ISSN 1678-4456.

DE QUADROS, D. L. et al. Oncogenic viral DNA related to human breast cancer found on cattle milk and meat. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, p. 102053, 2023/08/27/ 2023. ISSN 0147-9571. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014795712300111X> >.

DO NASCIMENTO, A. M. M. et al. The bovine leukemia virus infection prolongs immunosuppression in dairy cows during the periparturient period by sustaining higher expression of immunological checkpoints in T cells. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 263, p. 110636, Sep 2023. ISSN 0165-2427.

EGITO, A. A. et al. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. **BMC genetics**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2007. ISSN 1471-2156.

FAO, D. Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS). **Food and Agriculture Organization** <https://www.fao.org/dad-is/browse-by-country-and-species/en/> (ET 02.08. 2022), 2022.

FERNANDES, C. et al. Soroprevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros da região norte do estado do Tocantins, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 327-334, 2021. ISSN 0020-3653.

FINO, T. et al. Occurrence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in Crioula Lageana cattle. **J Anim Sci Adv**, v. 3, p. 1-170, 2013.

FIORAVANTI, M. S. et al. Resistance and resilience to diseases in local ruminant breeds: a focus on South America. **Archivos de zootecnia**, v. 69, n. 267, p. 338-352, 2020. ISSN 0004-0592.

FIORIN F.E., DA SILVA CASA M., GRIEBELER L.B., GOEDEL M.F., DO NASCIMENTO L.F.N., DAS NEVES G.B., FONTEQUE J.H. Prevalence of natural infection by Trypanosoma evansi in Crioula LAGEANA cattle. *Microbial Pathogenesis*. 4, 106143, 2023.

FLORENT, G.; DELGOFFE, J. C.; ZYGRAICH, N. Detection of antibodies to bovine leukemia virus in bovine milk samples with an ELISA involving two monoclonal antibodies. **Veterinary Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 89-93, 1988/09/01/ 1988. ISSN 0378-1135. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378113588901186> >.

FRÖLICH, K. et al. Serological survey for potential disease agents of free-ranging cervids in six selected national parks from Germany. **Journal of wildlife diseases**, v. 42, n. 4, p. 836-843, 2006. ISSN 0090-3558.

GAO, A.; KOUZNETSOVA, V. L.; TSIGELNY, I. F. Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104417, 2020/12/01/ 2020. ISSN 0882-4010. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088240102030783X> >.

GAUDRAY, G. et al. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. **Journal of virology**, v. 76, n. 24, p. 12813-12822, 2002. ISSN 0022-538X.

GILLET, N. et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. **Retrovirology**, v. 4, p. 18, Mar 16 2007. ISSN 1742-4690.

GIOVAMBATTISTA, G. et al. Characterization of bovine MHC DRB3 diversity in Latin American Creole cattle breeds. **Gene**, v. 519, n. 1, p. 150-158, 2013. ISSN 0378-1119.

GRAU, M.; MONTI, G. Prevalencia serológica predial e intrapredial para el virus de la leucosis bovina (VLB) en lecherías de las regiones de Los Ríos y de Los Lagos de Chile. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 42, n. 2, p. 87-91, 2010. ISSN 0301-732X.

HEALD, M. T. S. et al. The prevalence of anti-bovine leukemia virus antibodies in dairy cows and associations with farm management practices, production and culling in Ontario. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 14, n. 1, p. 45-55, 1992/10/01/ 1992. ISSN 0167-5877. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016758779290083R> >.

HEDRICK, P. W. et al. Major histocompatibility complex variation in the Arabian oryx. **Evolution**, v. 54, n. 6, p. 2145-51, Dec 2000. ISSN 0014-3820 (Print)

0014-3820.

HERNANDEZ, D.; MUÑOZ, J.; ÁLVAREZ, L. Dinámica de la leucosis bovina en el ganado criollo Hartón del Valle en infección natural. **Archivos de zootecnia**, v. 65, n. 251, p. 365-373, 2016. ISSN 1885-4494.

HERNÁNDEZ-HERRERA, D. Y. et al. Detección del virus de la leucosis bovina en ganado criollo colombiano mediante PCR-anidado. **Acta agronómica**, v. 60, n. 4, p. 312-318, 2011. ISSN 0120-2812.

HERNÁNDEZ-HERRERA, D. Y. H.; FLÓREZ, J. E. M.; FRANCO, L. Á. Genetic diversity of BoLA-DRB3 gene in Colombian creole Hartón del Valle cattle/Diversidad genética del gen BoLA-DRB3 en el ganado criollo colombiano Hartón del Valle/Diversidade genética do gene BoLA-DRB3 em gado crioulo colombiano Hartón del Valle. **CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 10, n. 1, p. 18, 2015. ISSN 1900-9607.

HOPKINS, S. G.; DIGIACOMO, R. F. Natural Transmission of Bovine Leukemia Virus in Dairy and Beef Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 107-128, 1997/03/01/ 1997. ISSN 0749-0720. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072015303674> >.

JAIN, N. **Essential of veterinary hematology**. copyrights by Lea and Febiger Philadelphia: USA 1993.

JOHNSON, R. Bovine leukemia virus. Part 1. Descriptive epidemiology, clinical manifestations, and diagnostic tests. **Compend Contin Educ Pract Vet**, v. 13, p. 315, 1991.

JOHNSON, R.; GIBSON, C. D.; KANEENE, J. B. Bovine leukemia virus: A herd-based control strategy. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 3, n. 4, p. 339-349, 1985/08/01/ 1985. ISSN 0167-5877. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016758778590011X> >.

JULIANO, R. S. et al. Soroepidemiologia da leucemia bovina (LB) em bovinos curraleiros dos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, p. 289-295, 2014. ISSN 1518-2797.

JÚNIOR, L. Á. L. et al. Influência da idade e do tamanho do rebanho na soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos produtores de leite tipo B, na região norte do estado do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 10, n. 2, 2003. ISSN 1984-7130.

KHALILIAN, M.; HOSSEINI, S. M.; MADADGAR, O. Bovine leukemia virus detected in the breast tissue and blood of Iranian women. **Microbial Pathogenesis**, v. 135, p. 103566, 2019/10/01/ 2019. ISSN 0882-4010. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401019301184> >.

KHUDHAIR, Y. I. et al. Serological and molecular detection of bovine leukemia virus in cattle in Iraq. **Emerging Microbes & Infections**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2016/01/01 2016. ISSN null. Available at: < <https://doi.org/10.1038/emi.2016.60> >.

KLEIN, J. et al. Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. **Immunogenetics**, v. 31, n. 4, p. 217-9, 1990. ISSN 0093-7711 (Print) 0093-7711.

KOBAYASHI, S. et al. Analysis of risk factors associated with bovine leukemia virus seropositivity within dairy and beef breeding farms in Japan: A nationwide survey. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 1, p. 47-53, 2014/02/01/ 2014. ISSN 0034-5288. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528813003767> >.

KUCZEWSKI, A. et al. Invited review: Bovine leukemia virus—Transmission, control, and eradication. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 6358-6375, 2021/06/01/ 2021. ISSN 0022-0302. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030221004203> >.

LEE, E. et al. Molecular epidemiological and serological studies of bovine leukemia virus (BLV) infection in Thailand cattle. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, p. 245-254, 2016/07/01/ 2016. ISSN 1567-1348. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134816301344> >.

LEI, W. et al. BoLA-DRB3 gene polymorphism and FMD resistance or susceptibility in Wanbei cattle. **Mol Biol Rep**, v. 39, n. 9, p. 9203-9, Sep 2012. ISSN 0301-4851 (Print) 0301-4851.

LO, C.-W. et al. BoLA-DRB3 Polymorphism is Associated with Differential Susceptibility to Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma and Proviral Load. **Viruses**, v. 12, n. 3, p. 352, 2020. ISSN 1999-4915. Available at: < <https://www.mdpi.com/1999-4915/12/3/352> >.

LO, C.-W. et al. Association of Bovine Leukemia Virus-Induced Lymphoma with BoLA-DRB3 Polymorphisms at DNA, Amino Acid, and Binding Pocket Property Levels. **Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 437, 2021. ISSN 2076-0817. Available at: < <https://www.mdpi.com/2076-0817/10/4/437> >.

MACHADO, M. et al. Associação do loco BoLA-DRB3. 2 com produção de leite em bovinos da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 380-389, 2005. ISSN 0102-0935.

MARIANTE, A. D. S.; CAVALCANTE, N. Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil= Animals of the Discovery: Domestic Breeds in the History of Brazil. **Embrapa, Brasília, DF**, 2000.

MARTINS, V. M. V. **Raça Crioula Lageana: o esteio do ontem, o labor do hoje a oportunidade do amanhã**. Associação Brasileira de Criadores da Raça Crioula Lageana, 2009.

_____. **Crioulo Lageano: as qualidades de um rústico**. Editora Autografia, 2021. ISBN 6559434494.

MATSUMOTO, M. et al. Consumption of dairy products and cancer risks. **Journal of epidemiology**, v. 17, n. 2, p. 38-44, 2007. ISSN 0917-5040.

MEGID, J. et al. Ocorrência de leucose enzoótica bovina na microrregião da Serra de Botucatu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 645-646, 2003. ISSN 0102-0935.

MEIRELLES, C. et al. Evolução da soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina em um rebanho bovino leiteiro universitário. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 3, p. 671-678, 2009. ISSN 1676-546X.

MESA, G. et al. Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue. 2013.

MILLER, J. M. et al. Virus-Like Particles in Phytohemagglutinin-Stimulated Lymphocyte Cultures With Reference to Bovine Lymphosarcoma2. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1297-1305, 1969. ISSN 0027-8874. Available at: < <https://doi.org/10.1093/jnci/43.6.1297> >. Accessed on: 8/23/2023.

MIRSKY, M. L. et al. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages of infection. **J Virol**, v. 70, n. 4, p. 2178-83, Apr 1996. ISSN 0022-538X (Print)
0022-538x.

MOROVATI, H. et al. Seroprevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Isfahan Province, Iran. **Tropical Animal Health and Production**, v. 44, n. 6, p. 1127-1129, 2012/08/01 2012. ISSN 1573-7438. Available at: < <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0062-4> >.

MURAKAMI, K. et al. The recent prevalence of bovine leukemia virus (BLV) infection among Japanese cattle. **Veterinary microbiology**, v. 148, n. 1, p. 84-88, 2011. ISSN 0378-1135.

NAVA, Z. et al. Seroprevalence of enzootic bovine leukosis and its association with clinical signs and risk factors in dairy herds from Barinas State, Venezuela. **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias**, v. 52, n. 1, p. 13-23, 2011. ISSN 0258-6576.

OLAYA-GALÁN, N. N. et al. Evidence of bovine leukemia virus circulating in sheep and buffaloes in Colombia: insights into multispecies infection. **Arch Virol**, v. 167, n. 3, p. 807-817, Mar 2022. ISSN 0304-8608 (Print)
0304-8608.

OPAS. **Bioestadística: procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo**. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, 1979.

OTT, S. L.; JOHNSON, R.; WELLS, S. J. Association between bovine-leukosis virus seroprevalence and herd-level productivity on US dairy farms. **Prev Vet Med**, v. 61, n. 4, p. 249-62, Dec 12 2003. ISSN 0167-5877 (Print)
0167-5877.

PAUL, P. S. et al. Evidence for the replication of bovine leukemia virus in the B lymphocytes. **Am J Vet Res**, v. 38, n. 6, p. 873-6, Jun 1977. ISSN 0002-9645 (Print)
0002-9645.

POKORSKA, J. et al. The influence of BoLA-DRB3 alleles on incidence of clinical mastitis, cystic ovary disease and milk traits in Holstein Friesian cattle. **Mol Biol Rep**, v. 45, n. 5, p. 917-923, Oct 2018. ISSN 0301-4851.

POLAT, M. et al. The molecular epidemiological study of bovine leukemia virus infection in Myanmar cattle. **Archives of Virology**, v. 162, n. 2, p. 425-437, 2017/02/01 2017. ISSN 1432-8798. Available at: < <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3118-y> >.

POLETTTO, R. et al. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v. 34, p. 595-598, 2004. ISSN 0103-8478.

PORTA, N. G. et al. Seroprevalence and risk factors associated with bovine Leukemia virus infection in argentine beef cattle. **Res Vet Sci**, v. 164, p. 104999, Sep 1 2023. ISSN 0034-5288.

RAJÃO, D. S. et al. Effects of bovine leukemia virus infection on crossbred and purebred dairy cattle productive performance in Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 891-899, 2014. ISSN 1676-546X.

RAMALHO, G. C. et al. Seroprevalence of enzootic bovine leukosis (EBL): a systematic review and meta-analysis. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 12, p. e43591211228-e43591211228, 2020. ISSN 2525-3409.

REISER, J. B. et al. Analysis of relationships between peptide/MHC structural features and naive T cell frequency in humans. **J Immunol**, v. 193, n. 12, p. 5816-26, Dec 15 2014. ISSN 0022-1767.

RESENDE, C. F. et al. Indirect ELISA (iELISA) standardization for the diagnosis of bovine enzootic leukosis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 40, p. 977-984, 2021. ISSN 0100-736X.

RODAKIEWICZ, S. M. et al. Heterogeneity determination of bovine leukemia virus genome in Santa Catarina state, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, 2018. ISSN 0020-3653.

SANDEV, N. et al. Prevalence of enzootic bovine leukosis in South-eastern Bulgaria during the period 1998-2000. **Veterinarski arhiv**, v. 71, n. 4, p. 215-221, 2001. ISSN 0372-5480.

SANTOS, G. R. et al. Análise epidemiológica da infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina (LEB), na microrregião Garanhuns, Pernambuco, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 35, n. 4, p. 371-377, 2013. ISSN 2527-2179.

SANTOS, H. et al. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados á Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos da bacia leiteira do estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 351-358, 2020. ISSN 0020-3653.

SARGEANT, J. M. et al. Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 31, n. 3, p. 211-221, 1997/08/01/ 1997. ISSN 0167-5877. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587796011403> >.

SCHWARTZ, I. et al. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. **J Virol**, v. 68, n. 7, p. 4589-96, Jul 1994. ISSN 0022-538X (Print) 0022-538x.

SCHWINGEL, D. et al. Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 2949, 2019. ISSN 2045-2322.

SERRANO, G. M. et al. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 543-549, 2004. ISSN 0100-204X.

ŞEVIK, M.; AVCI, O.; İNCE Ö, B. An 8-year longitudinal sero-epidemiological study of bovine leukaemia virus (BLV) infection in dairy cattle in Turkey and analysis of risk factors associated with BLV seropositivity. **Trop Anim Health Prod**, v. 47, n. 4, p. 715-20, Apr 2015. ISSN 0049-4747.

SPRITZE, Á. et al. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1157-1164, 2003. ISSN 0100-204X.

TAKESHIMA, S.-N. et al. Genetic diversity of BoLA-DRB3 in South American Zebu cattle populations. **BMC Genetics**, v. 19, n. 1, p. 33, 2018/05/22 2018. ISSN 1471-2156. Available at: < <https://doi.org/10.1186/s12863-018-0618-7> >.

TAKESHIMA, S. N. et al. Assessment of biodiversity in Chilean cattle using the distribution of major histocompatibility complex class II BoLA-DRB3 allele. **Tissue Antigens**, v. 85, n. 1, p. 35-44, 2014. ISSN 0001-2815.

TAKESHIMA, S. N.; OHNO, A.; AIDA, Y. Bovine leukemia virus proviral load is more strongly associated with bovine major histocompatibility complex class II DRB3 polymorphism than with DQA1 polymorphism in Holstein cow in Japan. **Retrovirology**, v. 16, n. 1, p. 14, May 16 2019. ISSN 1742-4690.

TEIXEIRA, W. T. et al. Transfer of passive immunity and serum proteinogram in the first six months of life of Criollo Lageano and Black and White Holstein calves. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 980-986, 2012. ISSN 0100-736X.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology : an introduction**. 8th ed. St. Louis, Mo.: Saunders St. Louis, Mo., 2009. ISBN 9781416049890; 1416049894.

TSUTSUI, T. et al. Fraction of bovine leukemia virus-infected dairy cattle developing enzootic bovine leukosis. **Prev Vet Med**, v. 124, p. 96-101, Feb 1 2016. ISSN 0167-5877.

UYVAL, A. et al. Seroprevalence of enzootic bovine leukosis in Trakya district (Marmara region) in Turkey. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1, p. 121-128, 1998/12/01/ 1998. ISSN 0167-5877. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587798001081> >.

VAN EIJK, M. J.; STEWART-HAYNES, J. A.; LEWIN, H. A. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. **Anim Genet**, v. 23, n. 6, p. 483-96, 1992. ISSN 0268-9146 (Print)

0268-9146.

VILAÇA, L. F. Polimorfismos do gene BoLA-DRB3 em rebanhos bovinos leiteiros 5/8 Girolando e Holandês no estado de Pernambuco. 2016.

WILLEMS, L. et al. Genetic determinants of bovine leukemia virus pathogenesis. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 16, n. 16, p. 1787-95, Nov 1 2000. ISSN 0889-2229 (Print)

0889-2229.

WOAH. Bovine Enzootic Leukosis. In: (Ed.). **Terrestrial Animal Health Code**. 29th Edition, v.1, 2021. chap. 3.4.9, p.800. ISBN 978-92-95115-40-8.

YAMANAKA, M. P. et al. No evidence of bovine leukemia virus proviral DNA and antibodies in human specimens from Japan. **Retrovirology**, v. 19, n. 1, p. 7, 2022/05/18 2022. ISSN 1742-4690. Available at: < <https://doi.org/10.1186/s12977-022-00592-6> >.

ZANOTTI, M. et al. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. **Anim Genet**, v. 27, n. 5, p. 337-41, Oct 1996. ISSN 0268-9146 (Print)

0268-9146.

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, p. 150-165, 2007/09/15/ 2007. ISSN 0042-6822. Available at: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682207002358> >.

ZHOU, H. et al. Short communication: Identification of allelic variation at the bovine DRA locus by polymerase chain reaction-single strand conformational polymorphism. **J Dairy Sci**, v. 90, n. 4, p. 1943-6, Apr 2007. ISSN 0022-0302.



Assinaturas do documento



Código para verificação: **02AYQT82**

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



LUIZ CLAUDIO MILETTI (CPF: 146.XXX.518-XX) em 18/12/2023 às 14:30:49

Emitido por: "SGP-e", emitido em 30/03/2018 - 12:39:46 e válido até 30/03/2118 - 12:39:46.

(Assinatura do sistema)

Para verificar a autenticidade desta cópia, acesse o link <https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo/conferencia-documento/VURFU0NfMTlwMjJfMDAwNTg1NzdfNTg2MzRfMjAyM18wMkFZUVQ4Mg==> ou o site <https://portal.sgpe.sea.sc.gov.br/portal-externo> e informe o processo **UDESC 00058577/2023** e o código **02AYQT82** ou aponte a câmera para o QR Code presente nesta página para realizar a conferência.