

Cairo Henrique Sousa de Oliveira

Linfoma multicêntrico em búfalos no Brasil: etiologia, patologia e clínica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor na área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Curso: Ciência Animal

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite.

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
2015

O481 Oliveira, Cairo Henrique Sousa de, 1987-
Linfoma multicêntrico em búfalos no Brasil: etiologia, patologia e clínica / Cairo Henrique Sousa de Oliveira. – 2015.
66 p. : il.

Orientador: Rômulo Cerqueira Leite
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Búfalo – Doenças – Teses. 2. Linfoma – Teses. 3. Imunohistoquímica – Teses.
I. Leite, Rômulo Cerqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

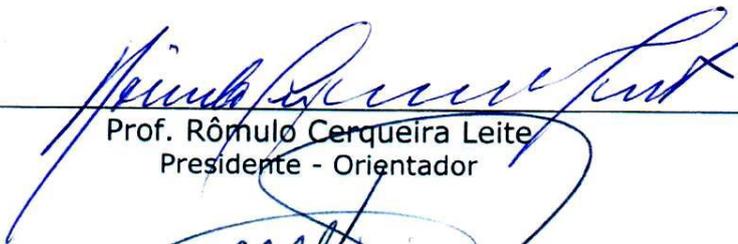
CDD – 636.293 089

FOLHA DE APROVAÇÃO

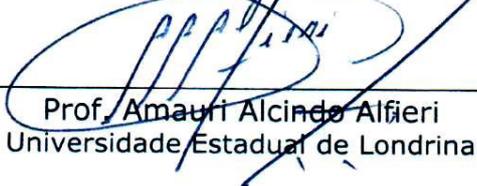
CAIRO HENRIQUE SOUSA DE OLIVEIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Rômulo Cerqueira Leite
Presidente - Orientador



Prof. Amauri Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina



Prof. Prof. David Driemeier
Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Prof. Jônatas Santos Abrahão
Universidade Federal de Minas Gerais - ICB



Profª. Zélia Inês Portela Lobato
Universidade Federal de Minas Gerais - EV

Aos analfabetos, na esperança de que um dia a transformação provocada pela educação,
pela leitura, pelo acesso à informação e pelo ensino de qualidade seja um bem presente
na vida de todos os brasileiros.

Pense grande, sonhe alto, mas caminhe sempre, sem parar, a passos curtos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Neusa Maria Sousa de Oliveira e Ironi Rodrigues de Oliveira, pela educação, moral, ética e apoio.

À minha avó, Divina Alves Lopes, pela criação, dedicação e bondade.

Ao meu irmão, Cassio Sousa de Oliveira, pelo companheirismo, amizade e apoio.

Aos tios, tias, primos e primas que desejaram o meu sucesso.

Ao professor Rômulo Cerqueira Leite, pela orientação, apoio incondicional, atenção, comprometimento, gerenciamento, honestidade e pela prazerosa amizade. À sua esposa Suely Siqueira Leite, pelo acolhimento, carinho, amizade, compaixão e as maravilhosas viagens.

Ao professor Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, pela orientação, ensinamentos técnicos, profissionalismo, dedicação, liderança, apoio e amizade.

À doutora Graciela Kunrath Lima, pela orientação, ensinamentos técnicos e profissionalismo.

Ao professor Diomedes Barbosa Neto, por me ensinar a ser veterinário, por incentivar minha carreira profissional, por atender cada questionamento ou solicitação, pelo profissionalismo, dedicação, honestidade, assiduidade, comprometimento, entusiasmo e pela preciosa amizade.

Ao professor Carlos Magno Chaves de Oliveira, pela ajuda profissional e humildade.

Ao professor Carlos Maria Antônio Hubinger Tokarnia e professora Marilene Farias Brito, pela histopatologia e por serem exemplo de simplicidade e competência.

Ao professor Geovanni Dantas Cassali e a doutoranda Karine Araújo Damasceno, pelas análises imunohistoquímicas.

Ao Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos (Aquavet) e ao Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG, pelo sequenciamento.

À professora Edel Figueiredo Barbosa Stancioli pelo carinho, inteligência, amizade e orientação.

Ao professor Marcos Bryan Heinemman, pela amizade, humildade, força de vontade e conhecimento.

Aos professores Aluizio Otavio Almeida da Silva e José Silva de Souza da CEBRAN-UFPA por permitirem a coleta de amostras.

À professora Roselene Ecoo e às doutorandas Juliana Fortes e Michelle Gabardo pela ajuda na extração de amostras em parafina.

Ao Rafael Romero Nicolino pela confecção do mapa do Brasil.

À minha namorada, Mayara Ferreira Brito, pelo companheirismo, apoio, entendimento dos momentos difíceis, paciência e amor.

À família Retrolab - Laboratório de Retrovírus, André Penido Oliveira, Paula Maria Pires do Nascimento, Fernanda Gonçalves de Oliveira, Gissandra Farias Braz, João Helder Frederico Farias Naves, Stefanne Aparecida Gonçalves, Cláudia Fideles Resende, Telissa da Cunha Kassar, Juliana Marques Bicalho, Ana Paula de Souza Rodrigues, Camila Pacheco Silveira Martins da

Mata, Bruna Lopes Bueno, Luciana Dias da Cunha Braga, Clara Nunes, Agda de Moraes Leite, Lúzia Cassia Silveira da Cunha, Rafaela Ribeiro Barbosa, Isabella Luiza Souza Abreu, Anna Christina Bomfim Machado de Siqueira, Érica Mendes e Júlio Cesar Braga Ribeiro, pela convivência, ensinamentos, conselhos, experimentos, diversão, descontração, brigas e amizade.

Ao Ermilton Júnio Pereira de Freitas, João Helder Frederico de Farias Naves, André Penido Oliveira e Daniel Sobreira Nobrega pela amizade e momentos de diversão em Belo Horizonte.

Aos amigos do Pará, André Gibson, Arnaldo Algaranhar e Sebastião Soares Filho.

Aos amigos da Clínica de Ruminantes da Universidade Federal do Pará, Tatiane Teles Albarnaz, Natalia Silva e Silva, Alessandra dos Santos Belo Reis, Henrique dos Anjos Bomjardim, Danillo Henrique da Silva, Wagner Marcelo Sousa Vinhote, Cíntia Távora de Albuquerque Lopes, Karinny Ferreira Campos, Nayra Fernanda de Queiroz Ramos Freitas, Elda Ely Gomes de Souza, Marcos Dutra Duarte e José Alcides Sarmento da Silveira, pela ajuda técnica.

Ao INCT-Pecuária, Cnpq, Capes e Fapemig pelo apoio financeiro.

À Escola de Veterinária da UFMG pelo programa de pós-graduação em Ciência Animal.

Aos técnicos do DMVP-UFMG, Grazielle Cossenso Florentino Galinari, Agda de Moraes Leite e Eduardo Nunes Nogueira pela competência, paciência e ajuda profissional.

À secretária Renata Martins Pelli Canhestro do DMVP-UFMG, Adriana Cristina Pereira e Mirli Rosa do INCT-PECUARIA pela colaboração.

Aos funcionários dos serviços gerais da UFMG, em nome da faxineira Lúcia Fernandes de Magalhães, por tornarem possível a rotina das nossas atividades de pesquisa.

À Deus por todos os anteriores e por tornar oportuno a vida.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	13
2.1. O búfalo no Brasil	13
2.1.1. Produção de carne.....	14
2.1.2. Produção de leite	15
2.1.3. Tração animal.....	15
2.1.4. Sanidade.....	16
2.2. Linfoma	16
2.2.1. Linfoma em humanos	16
2.2.2. Linfoma em felinos.....	17
2.2.3. Linfoma em bovinos	18
2.2.4. Linfoma em búfalos	18
2.3. Bovine leukemia virus (BLV)	20
2.3.1. Biologia.....	20
2.3.2. Sinais clínicos.....	21
2.3.3. Diagnóstico	21
2.3.4. Epidemiologia	22
2.3.5. BLV em búfalos	22
2.4. Bovine immunodeficiency virus (BIV)	23
2.4.1. Biologia.....	23
2.4.2. Sinais clínicos.....	24
2.4.3. Diagnóstico	24
2.4.4. Epidemiologia	25
2.5. Bovine herpesvirus 6 (BoHV-6)	25
2.5.1. Biologia.....	25
2.5.2. Epidemiologia	26
2.6. Referências Bibliográficas	28
3. CAPÍTULO 1: Estudo da infecção pelo <i>Bovine leukemia virus</i> (BLV) em bubalinos da região amazônica e sudeste do Brasil	36

3.1. Resumo	36
3.2. Introdução	36
3.3. Material e métodos	37
3.4. Resultados	40
3.5. Discussão	41
3.6. Conclusão	42
3.7. Referências bibliográficas	42
4. CAPÍTULO 2: <i>Bovine herpesvirus 6</i> em búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>) da região amazônica, Brasil	44
4.1. Resumo	44
4.2. Introdução	44
4.3. Material e Métodos	45
4.4. Resultados e discussão	45
4.5. Referências Bibliográficas	49
5. CAPÍTULO 3: Linfoma multicêntrico em búfalos da região Amazônica, Brasil	51
5.1. Resumo	51
5.2. Introdução	51
5.3. Material e métodos	52
5.4. Resultados	54
5.5. Discussão	61
5.6. Conclusão	62
5.7. Referências bibliográficas	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
7. ANEXOS	66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Comparação dos testes de diagnóstico sorológico para o *Bovine leukemia virus* (BLV) em amostras de soro de bubalinos, por meio das técnicas de IDGA, ELISA para a glicoproteína gp51 (ELISA-gp51) e ELISA para a partícula viral inteira (ELISA-BLV).....40

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Ocorrência do *Bovine herpesvirus 6* em bubalinos e bovinos dos estados de Minas Gerais e Pará, Brasil, pela técnica de seminested PCR para o gene *pol* (BoHV6-pol-PCR).....46

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 3

Quadro 1. Dados epidemiológicos e patológicos de quatro casos clínicos de linfoma em búfalos de uma propriedade (A-PA) localizada no estado do Pará, Brasil.....56

LISTA DE FIGURAS

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Figura 1. Raças de búfalos no Brasil.....14

CAPÍTULO 1

Figura 1. Mapa do Brasil mostrando os estados e municípios de onde foram coletadas as amostras de sangue e soro de bubalinos das raças Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi para estudo da infecção pelo BLV.....38

Figura 2. Eletroforese dos produtos da PCR para a região do gene *tax* (PCR-tax) (A) e *env* (PCR-gp51) (B) do *Bovine leukemia virus* em amostras de bubalinos.....41

CAPÍTULO 2

Figura 1. Eletroforese dos produtos da seminested PCR para a região do gene *pol* (BoHV6-pol-PCR) (A) e PCR convencional para o gene *gB* (BoHV6-gB-PCR) (B) do *Bovine herpesvirus 6* em amostras de DNA obtido do sangue total de bubalinos.....46

Figura 2. Árvores filogenéticas baseadas na sequência de aminoácidos do BoHV-6, gene *pol* (a) e gene *gB* (b) mostra que todas as amostras brasileiras do BoHV-6 obtidas de búfalos (ponto preto) e bovinos (ponto branco) foram agrupadas no gênero *Macavirus*, subfamília *Gammaherpesvirinae*.....48

CAPÍTULO 3

Figura 1. Linfoma em bubalinos.....55

Figura 2. Lesões macroscópicas em bubalinos com linfoma multicêntrico.....57

Figura 3. Histologia e imunohistoquímica caso clínico 04.....59

Figura 4. Alinhamento, pelo método ClustalW, da sequência de nucleotídeos de parte do gene *pol* do *Bovine immunodeficiency virus* (BIV).....60

RESUMO

Neste estudo realizamos pela primeira vez o relato da ocorrência de linfoma em búfalos no Brasil e conduzimos um estudo clínico, etiológico e patológico da enfermidade. Alguns autores descreveram essa doença como sendo casos de leucose bovina, porém o *Bovine leukemia virus* (BLV) não foi detectado em nenhuma das 314 amostras de soro e sangue de búfalos provenientes de rebanhos com e sem histórico de linfoma. Os soros foram avaliados por IDGA e ELISA, e o sangue por duas PCRs. Utilizando seminested PCR, o *Bovine herpesvirus 6* (BoHV-6) foi detectado em 2,23% dessas amostras. Apesar do potencial oncogênico dos gammaherpesvírus, o BoHV-6 não tem papel definido como causador de enfermidade em bovinos e foi, nessa investigação, detectado pela primeira vez em búfalos. Detectamos ainda o *Bovine immunodeficiency virus* em amostras de tumor, rins e linfonodo de um búfalo enfermo, as quais foram negativas para BLV e BoHV-6. Por meio de imunohistoquímica verificou-se que a doença neoplásica nos búfalos foi caracterizada pela ocorrência de linfoma multicêntrico de células B. Os principais sinais clínicos são linfadenomegalia e emagrecimento progressivo, na patologia observa-se nódulos miliares nas serosas de órgãos e massas tumorais com localizações variadas. A etiopatogenia dos linfomas em bubalinos ainda não está esclarecida e é importante considerar o papel oncogênico dos lentivírus.

Palavras-chave: linfoma, búfalo, BLV, BoHV-6, BIV e Brasil.

ABSTRACT

In this study we described for the first time the occurrence of lymphoma in buffaloes from Brazil and conducted a clinical, etiological and pathological research. Although some authors described this disease as enzootic bovine leucosis in buffalo, the etiologic agent *Bovine leukemia virus* (BLV) was not detected in 314 buffalo's serum and whole blood samples from herds with and without lymphoma history. Serum samples were evaluated by AGID and ELISA, and whole blood by two PCRs. *Bovine herpesvirus 6* (BoHV-6) was detected in 2.23% of these samples by seminested PCR. Despite the oncogenic potential of gammaherpesvirus, as *Epstein Barr virus* (EBV) associated with lymphoma occurrence in humans, BoHV-6 has no defined role as illness agent in cattle and was detected for the first time in buffaloes. By immunohistochemistry was found that the neoplastic disease in buffaloes was characterized by B cell multicentric lymphoma. The mainly clinical signs were lymphadenopathy and progressive weight loss, in the pathology can be observed miliary nodules on organs serous and large tumor masses with different body locations. We detected *Bovine immunodeficiency virus* (BIV) in tumor samples, kidney and lymph nodes from a sick buffalo, what indicates it is important to consider the indirect role of lentivirus as cancer-inducing agent.

Keywords: lymphoma, buffalo, BLV, BoHV-6, BIV and Brazil.

1. INTRODUÇÃO

A bubalinocultura é uma atividade pecuária que contribui para o agronegócio brasileiro. Os búfalos são criados principalmente para a produção de carne e leite, porém, a possibilidade de exploração em atividades de tração e transporte faz dessa espécie um animal de tripla aptidão. Mais de cinquenta por cento do rebanho encontra-se na região norte, em especial na Ilha de Marajó - Pará, entretanto a expansão da atividade para as outras regiões do país tem sido impulsionada com o aumento da comercialização de derivados lácteos com alto valor agregado.

A mozzarella de búfala é o produto mais conhecido produzido a partir do leite da búfala, que por sua composição química diferenciada, faz com que esse queijo tenha boa qualidade e, devido ao apelo nutricional, atinja consumidores exigentes. Para o produtor a vantagem está no preço pago pelo litro do leite, que pode alcançar até duas vezes o pago pelo leite bovino, e na rusticidade da espécie, bem adaptada ao clima tropical e resistente a algumas enfermidades que acometem os bovinos. O mercado da carne bubalina tem potencial para crescimento, uma vez que a carne apresenta menor quantidade de gordura, colesterol e possui mais Omega-3 em relação à bovina, porém a maior parte ainda é comercializada como carne bovina.

No Brasil, os fazendeiros que praticam a bubalinocultura eram criadores de bovinos no passado ou consorciavam a criação das duas espécies. Dessa forma, são comuns o manejo e a transferência de conhecimento gerado na espécie bovina para a espécie bubalina. Porém deve-se levar em consideração as particularidades das espécies para não estabelecer confusões e conceitos equivocados.

Um exemplo das diferenças entre espécies pode ser observado na sanidade dos animais. Bubalinos são mais resistentes a infestação por carrapatos, problemas do aparelho locomotor, digestório e intoxicação por plantas quando comparados aos bovinos. Ao mesmo tempo são mais sensíveis a infestação por piolhos e eimeriose, o que torna importante o estudo das enfermidades e mecanismos envolvidos na ocorrência de doenças na espécie bubalina.

No ano de 1969, no município de Porto de Mós, estado do Pará, foi observado uma búfala apresentando linfoma em diversas regiões do corpo, devido à dificuldade de acesso ao rebanho e de técnicas para o diagnóstico, não foi realizado um estudo sobre a etiologia da doença (Rômulo Cerqueira Leite, comunicação pessoal). De forma semelhante, tem sido observado ao longo dos últimos dez anos a ocorrência de linfoma em búfalos na região de Castanhal, Pará (José Diomedes Barbosa, comunicação pessoal). Os resultados negativos desses animais para o *Bovine leukemia virus* (BLV), principal agente causador de linfoma em bovinos, motivou a realização do presente estudo.

O objetivo foi descrever a ocorrência de linfoma em búfalos no Brasil e realizar um estudo clínico, etiológico e patológico dessa enfermidade. Os resultados são apresentados ao longo de três capítulos, na forma de artigos científicos. O primeiro mostra que o búfalo parece não ser naturalmente infectado pelo BLV. O segundo apresenta os dados sobre a detecção do *Bovine herpesvirus 6* em amostras sanguíneas de búfalos, fornecendo novos dados epidemiológicos sobre a ocorrência desse vírus, ainda sem um papel patogênico definido. E o terceiro descreve a clínica e patologia macro e microscópica dos linfomas em bubalinos do estado do Pará, tendo como importante achado a detecção do *Bovine immunodeficiency virus* em amostras teciduais de um bubalino enfermo.

2. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

2.1. O búfalo no Brasil

Os bubalinos são ruminantes da família *Bovidae*, subfamília *Bovinae*, tribo *Bovini*, assim como os bovinos. Esses últimos são do gênero *Bos*, já os bubalinos são do gênero *Syncerus* ou do gênero *Bubalus*. Os búfalos do gênero *Syncerus* são conhecidos como búfalos africanos, espécie *Syncerus caffer*, que é um animal agressivo, não domesticado, presente principalmente no continente africano (Scherf, 2000).

O búfalo doméstico é do gênero *Bubalus*, espécie *Bubalus bubalis*, também conhecido como búfalo de água (do inglês “water buffaloes”). Estes são animais dóceis, domesticados e explorados em atividades pecuárias. Existem dois tipos, os búfalos de rio (do inglês “river buffaloes”, 2n=50) e o búfalo de pântano (do inglês “swamp buffaloes”, 2n=48). No Brasil existem três raças dos búfalos de rio: Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi, e uma raça do búfalo de pântano: Carabao (Kierstein et al., 2004) (Figura 1).

De acordo com dados da Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos (ABCB), os bubalinos chegaram ao Brasil no ano de 1890 ou 1895 trazidos por foragidos da Guiana Francesa em um navio que aportou na Ilha de Marajó, estado do Pará e por meio de algumas importações. A última entrada de animais no país foi em 1962, após autorização especial pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com a importação de búfalos das raças Jafarabadi e, principalmente, Murrah trazidos da Índia. Os poucos dados existentes sobre a introdução dos búfalos no Brasil apontam que o rebanho atual originou-se de apenas 500 animais (Bastianetto, 2009).

O rebanho brasileiro atual é de 1.332.284 bubalinos, sendo que 66% desses animais são criados na região norte do país, principalmente no estado do Pará. Em Minas Gerais, o efetivo é de 57.433 animais (Brasil, 2013).

Os búfalos são animais rústicos e bem adaptados a criação em ambientes menos enriquecidos. Essas características estimulam a expansão da atividade devido à eficiência produtiva dos búfalos em criação extensiva em regiões de clima tropical e subtropical. Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) existem mais pessoas no mundo dependendo da espécie bubalina do que de outras espécies de animais domésticos (Scherf, 2000)

No Brasil os búfalos são criados para a produção de carne, de leite e para tração animal.



Figura 1. Raças de búfalos no Brasil. O búfalo doméstico é da espécie *Bubalus bubalis*, no Brasil existem três raças de búfalos do tipo rio: (A) Murrah, (B) Mediterrâneo e (C) Jafarabadi; e uma raça de búfalo do tipo pântano: (D) Carabao.

2.1.1. Produção de carne

A criação de búfalos no Brasil para a produção de carne é realizada geralmente em sistema extensivo (Bernardes, 2007). A maior parte das propriedades é caracterizada por possuir pastagens cultivadas ou nativas onde os búfalos são manejados durante todas as etapas do processo de produção da carne, isto é, cria, recria e engorda. Não é comum o uso de alimentos concentrados a base de alimentos energéticos ou proteicos e, frequentemente, os animais são criados conjuntamente com a espécie bovina. As raças Murrah, Mediterrâneo e Jafarababi são as mais exploradas nesse tipo de produção (Jorge, 2005).

A carne bubalina apresenta características organolépticas semelhantes à carne bovina, contudo a composição nutricional é superior: menor quantidade de lipídeos, menor teor de colesterol e maior quantidade de ácidos graxos polinsaturados (Omega-3) (Oliveira, 2005). Porém, a população brasileira não tem a cultura de ingerir a carne de búfalo, motivado pelo desconhecimento e pelo falso conceito de que a carne é dura e escura, em razão da comercialização de animais velhos (Luz e Andrighetto, 2013). Portanto, 90% dessa carne é comercializada como sendo carne bovina (Oliveira, 2005), prática comum na região norte do país, onde a produção de carne bubalina tem maior expressividade.

Investimentos em marketing e propaganda podem reverter esse cenário. Já existem empresas especializadas na produção e comercialização da carne bubalina, nos estados de Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Sul e São Paulo, cujas estratégias de mercado agregam maior valor ao produto final, com o abate de animais jovens entre 18 a 24 meses fornecendo carne de boa qualidade (Bastianetto, 2009).

2.1.2. Produção de leite

A produção de leite de búfalas está em expansão no país. Ao contrário da carne, o leite bubalino é utilizado para a produção de derivados com alto valor agregado, caso da mozzarella (Malhado et al., 2007). A mozzarella tem boa aceitação no mercado brasileiro sendo um produto mais consumido pela população de classe média ou alta em saladas e pratos gourmet.

A criação de búfalos para produção de leite é realizada, principalmente, em sistema semi-intensivo, e com maior expressividade nas regiões sul e sudeste do Brasil (Macedo et al., 2001). A produção é realizada a pasto e os animais recebem suplementação de alimentos concentrados durante algum período do dia. Na época das secas, devido à baixa disponibilidade de pastagem, é também comum a suplementação de alimentos volumosos, como cana de açúcar, silagem e capineiras (Bernardes, 2007).

A média de produção de leite por animal é mais baixa quando comparada aos bovinos, entretanto o leite da búfala apresenta um rendimento industrial superior, fazendo com que o preço pago pelo litro alcance até duas vezes o praticado para o leite bovino (Bernardes, 2007).

As raças Murrah e Mediterrâneo são as mais exploradas para a produção de leite no Brasil (Macedo et al., 2001; Malhado et al., 2007). O manejo reprodutivo comumente empregado é a monta natural, porém o uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) tem aumentado. A IATF oferece como vantagem o melhoramento genético, por possibilitar o uso de sêmen de reprodutores com elevado potencial genético, e a desestacionalização do rebanho, uma vez que as búfalas são poliestrais de dias curtos (Carvalho et al., 2013).

2.1.3. Tração animal

Com a aquisição de tratores e equipamentos agrícolas é cada vez menos comum o uso de animais para tração em atividades rurais. Por outro lado, os búfalos são animais fortes e deslocam-se com facilidade em áreas alagadas e pantanosas (Oliveira, 2005), portanto ainda são utilizados em alguns lugares para transporte de cargas e pessoas, em carroças ou em montaria. A Ilha de Marajó, estado do Pará, é o lugar no Brasil onde essa prática é facilmente observada, existindo, inclusive, esportes regionais envolvendo o uso desses animais, geralmente da raça Carabao.

2.1.4. Sanidade

Os bubalinos aparentam-se fenotipicamente com os bovinos e por isso são manejados de forma semelhante. Dessa forma, é comum a transferência de conhecimentos gerados na espécie bovina para a espécie bubalina (Bastianetto, 2009). Porém, é necessária uma análise cautelosa, em um estudo que comparou a evolução genética de bovinos e bubalinos, os autores compararam a sequência de 273.000 nucleotídeos referentes à regiões codificantes de 86 genes ortólogos entre as duas espécies e identificaram 3% de divergência, incluindo genes relacionados com imunidade e doenças (Moaen-ud-Din e Bilal, 2015). Esse alto grau de divergência aponta para a importância do estudo da espécie bubalina, mas não descarta a possibilidade de inferências com a espécie bovina.

Os búfalos são considerados animais rústicos e resistentes a algumas enfermidades. De fato existem algumas enfermidades que afetam a espécie bovina e são também observadas na espécie bubalina como a brucelose (Da Silva et al., 2014), tuberculose (Barbosa et al., 2014), febre aftosa (Madhanmohan et al., 2014) e parasitoses (Choubisa e Jaroli, 2013), fazendo com que os programas nacionais de prevenção, controle e erradicação de doenças abordem essas espécies de forma conjunta.

Por outro lado, existem enfermidades contra as quais os búfalos são mais resistentes, como: intoxicação por plantas (Barbosa et al., 2003; De Oliveira et al., 2013), mamite (Tsonev et al., 1975; Osman et al., 2009), problemas digestivos, infestação por carrapatos, entre outras. Ao mesmo tempo que existem enfermidades que os búfalos são mais sensíveis, como a eimeriose (de Noronha et al., 2009) e intoxicação por antibióticos ionóforos (Rozza et al., 2006; Rozza et al., 2007). Isso mostra que a espécie bubalina apresenta particularidades que devem ser investigadas.

2.2. Linfoma

Linfoma é uma doença do sistema linfático. A enfermidade é caracterizada pela proliferação anormal de linfócitos, que são as células de defesa do sistema imune adaptativo (Campo et al., 2011).

Os linfócitos podem ser do tipo B, T e células NK, de forma que qualquer um dos três podem sofrer transformação neoplásica resultando em linfoma. Os linfomas são amplamente estudados na espécie humana. A etiologia pode envolver fatores genéticos, hábitos alimentares e de saúde, porém grande parte deles está associada a infecção por alguns vírus (Pasqualucci, 2013; Castillo et al., 2014). Nos animais domésticos, linfomas infecciosos são observados com mais frequência na espécie felina e bovina (Beatty, 2014; Panziera et al., 2014). Em búfalos a doença é pouco relatada e estudada.

2.2.1. Linfoma em humanos

Existem dois tipos de linfoma em humanos, os linfomas de Hodgkin e os linfomas não Hodgkin. Os linfomas de Hodgkin são linfomas de células B e na histopatologia apresentam uma célula

multinucleada chamada célula de Reed-Sternberg, sendo que esses linfomas são observados com maior frequência em pacientes até os 18 anos de idade (Allen et al., 2015).

Os linfomas não Hodgkin são os mais frequentes em adultos. Existem cerca de 60 tipos/subtipos classificados de acordo com a morfologia, genética, apresentação clínica, tipo de linfócito neoplásico (podendo ser B, T, células NK e linfocíticas não diferenciadas) e perfil de marcadores expressos na superfície celular (imunofenótipo) (Campo et al., 2011). O mais prevalente é o linfoma difuso de grandes células B em indivíduos adultos (Pasqualucci, 2013). Na África, o linfoma de Burkitt ocorre de forma endêmica em crianças (Magrath, 2012).

A etiologia dos linfomas é multivariada, podendo ter influência genética, hábitos alimentares, de saúde e presença de outras doenças predisponentes. Os linfomas de Hodgkin, linfoma de Burkitt e linfoma difuso de grandes células B estão associados com a infecção pelo *Epstein barr virus* (EBV), um herpesvírus da subfamília *Gammaherpesvirinae*, gênero *Lymphocryptovirus* que tem potencial oncogênico comprovado na espécie humana (Rowe et al., 2014; Vockerodt et al., 2015).

Pacientes com imunodeficiência, como os indivíduos com AIDS e os submetidos a transplante de órgãos, têm predisposição ao desenvolvimento de linfomas, a maioria deles também associada a infecção pelo EBV (Allen et al., 2015).

Os sinais clínicos observados em pacientes com linfoma são aumento indolor de gânglios (linfonodos), febre baixa, emagrecimento e sudorese noturna (Yung e Linch, 2003; Shankland et al., 2012). A confirmação do diagnóstico é feita por histopatologia após retirada cirúrgica de um linfonodo afetado. O estudo imunohistoquímico é utilizado para classificação dos linfomas e o paciente é submetido a exames complementares para realizar o estadiamento da doença. O estadiamento da enfermidade é realizado com base nas cadeias ganglionares afetadas, presença ou não de tumores em outros órgãos e/ou nos ossos (Murphy, 1980).

O tratamento cirúrgico não é indicado por se tratar de uma doença do sangue, isso é, uma doença multisistêmica. De acordo com a classificação do linfoma, grau de doença (estadiamento) e prognóstico pode-se optar por diferentes protocolos de quimioterapia, radioterapia e/ou utilização de terapia com anticorpos monoclonais contra células neoplásicas (De Tullio et al., 2014; Intlekofer e Younes, 2014).

Outra causa de linfoma em humanos é o retrovírus *Human T-cell leukemia virus type 1* (HTLV-1) que provoca leucemia/linfoma de células T em adultos (ATL) e desordens inflamatórias (HAM/TSP) após infecção crônica. O HTLV-1 provoca alterações no ciclo celular, apoptose, inativação de supressores de tumor, reparo do DNA, resposta imune e inflamatória, com a expressão de uma proteína oncogênica, Tax, importante na patogênese da ATL juntamente com a proteína HBZ que interfere na proliferação celular (Zane et al., 2010; Thenoz et al., 2014). A infecção pelo HTLV-1 é alta no Brasil, com destaque para os estados do Pará, Maranhão, Bahia, Amapá e Pernambuco (Catalan-Soares et al., 2005)

2.2.2. Linfoma em felinos

O principal agente associado a ocorrência de linfoma em gatos domésticos é o *Feline leukemia virus* (FeLV), 70% dos casos de linfoma em gatos podem estar associados a esse vírus (Cotter et al., 1975; Shelton et al., 1990). O FeLV é um retrovírus da subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Gammaretrovirus*, que infecta o gato doméstico e outros felinos.

O FeLV é um vírus pancitotrópico o que resulta em patologias degenerativas ou proliferativas, cujas manifestações clínicas incluem citopenias, infecções oportunistas, desordens mieloproliferativas, doenças imunomediadas, enterites e problemas reprodutivos (Beatty, 2014).

Os linfomas associados ao FeLV são geralmente de linfócitos T e de células não diferenciadas. Animais infectados pelo FeLV tem 62 vezes mais chance de desenvolver linfoma comparado aos não infectados (Hartmann, 2012). O vírus atua de forma direta na indução dos tumores. O mecanismo mais importante é a inserção do FeLV próximo a oncogenes do hospedeiro (comumente o gene *myc*), resultando em ativação e superexpressão desses genes (Hartmann, 2012). O vírus pode fazer recombinação incorporando oncogenes do hospedeiro e ao entrar em uma nova célula esse vírus recombinante é oncogênico (Tsatsanis et al., 1994). Um terceiro mecanismo é a produção de um RNA transativador de transcrição proveniente da região *U3-LTR* do FeLV, esse RNA, não codificante, ativa vias de sinalização celular relacionadas com o crescimento celular e inibição da apoptose, como a ativação de NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) (Abujamra et al., 2006; Forman et al., 2009).

Outro importante agente viral em felinos é o *Feline immunodeficiency virus* (FIV), um retrovírus da subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus*. Ao contrário do FeLV, animais infectados pelo FIV não apresentam manifestações clínicas evidentes, permanecendo assintomáticos por longos períodos (Hartmann, 2012). A manifestação clínica observada com maior frequência em animais experimentalmente e naturalmente infectados pelo FIV é a ocorrência de linfomas de células B (Beatty, 2014). Os animais infectados têm aproximadamente 5 vezes mais chances de desenvolver a doença comparados aos não infectados (Hartmann, 2012).

O mecanismo exato de como o FIV promove a formação de linfomas não é esclarecido. A hipótese é de que o vírus atue de forma indireta, assim como o HIV em pacientes humanos com linfoma, reduzindo os mecanismos de vigilância do sistema imune devido a imunodeficiência induzida por esses vírus (Burnet, 1970; Beatty et al., 1998; Schmiedt et al., 2009). Além disso, o FIV pode estar envolvido na expansão policlonal de células B, o que predispõe a mutações oncogênicas (Beatty, 2014).

2.2.3. Linfoma em bovinos

A principal causa de linfoma em bovinos é a infecção pelo *Bovine leukemia virus* (BLV). Um a cinco por cento dos bovinos infectados por este vírus desenvolvem linfoma, doença conhecida com leucose enzoótica bovina (EBL). Devido à importância desse assunto esse tema será abordado no item 2.3. *Bovine leukemia virus* (BLV).

2.2.4.. Linfoma em búfalos

Poucos são os estudos sobre a ocorrência de linfoma em búfalos, além disso, existem apenas relatos da ocorrência da neoplasia em animais da Índia e da Venezuela.

O primeiro relato de lesões compatíveis com linfoma em búfalos foi realizado na Índia em 1967 de forma acidental (Bhattacharya, 1967). O autor do estudo observou no ano de 1960, analisando patologias do trato respiratório em 646 búfalos abatidos em abatedouro, 11 animais apresentando

lesões de linfoma. Nos anos seguintes 1961-62 outros 217 casos envolvendo pericárdio e epicárdico foram observados entre 2306 animais. De 1962 a 1967 observou-se uma ocorrência de 10% (826 de 6745) entre búfalos abatidos em diferentes abatedouros da Índia. As lesões variavam de flóculos (nódulos miliares), nódulos e papilas de crescimento contínuo e aspecto aveludado nas superfícies parietal e visceral de membranas serosas. O envolvimento de linfonodos variava de discreta tumefação até diversos graus de aumento de volume.

Novamente na Índia, em 1968, lesões de linfoma foram mais uma vez relatadas em búfalos de abatedouro (Singh, 1968). Em animais adultos a ocorrência foi de 17,8% (n=5318) e em animais com até dois anos de idade foi de 1,23% (n=648). As lesões foram semelhantes às observadas por Bhattacharya (1967), de forma que os linfonodos envolvidos estavam de 10 a 20 vezes aumentados e lesões de crescimento contínuo e com aspecto aveludado ou de couve-flor cresciam em membranas serosas de diversos órgãos e no omento. O autor estudou o fluido peritoneal e pericárdico de animais com linfoma encontrando média de 70500 e 50350 leucócitos/mm³, respectivamente, sendo a maioria linfócitos.

Massas tumorais com grande envolvimento dos pulmões foram relatadas na Índia em búfalos. As lesões microscópicas foram caracterizadas por grandes agregados linfo-foliculares formados por linfoblastos e linfócitos, substituindo a estrutura alveolar normal dos pulmões (Singh et al., 1973). O infiltrado de células neoplásicas apresentava várias figuras de mitose. Lesões também foram observadas em outros órgãos e linfonodos. Os autores discutiram sobre a possibilidade de envolvimento de um agente etiológico viral devido à característica multicêntrica da enfermidade.

Outros relatos, também na Índia, incluem um caso de leucemia linfoide em uma búfala onde a contagem de leucócitos foi de 50050 por μ L de sangue, juntamente com a presença de linfoma em diversos órgãos (Gupta et al., 1977). Esses autores também relataram uma forma tímica da doença em uma búfala de oito anos. Em outro estudo observou-se casos envolvendo o sistema endócrino e reprodutivo (Singh et al., 1980).

Singh et al. (1979) realizaram um estudo clínico-patológico de 50 casos clínicos e 283 casos de abatedouro de linfoma em búfalos. A contagem de leucócitos nos 50 casos clínicos não apresentou um padrão definido, onde em apenas dois casos apresentou valor acima de 20000 linfócitos/ μ L de sangue. Foram observados diversos graus de envolvimento dos linfonodos e em alguns casos foram observados nódulos no tecido subcutâneo em diferentes localizações. Microscopicamente, os linfonodos afetados apresentaram proliferação de células linfoides, principalmente linfoblastos e/ou linfócitos, substituindo a arquitetura normal do órgão, resultando em completa desorganização. Infiltrados neoplásicos foram observados no coração, rins, fígado, abomaso, intestinos, hipófise, adrenal, nervos periféricos, diafragma, rúmen, uretra, úbere, vesícula seminal, testículos, epidídimo, retículo, tireoide, glândula bulbouretral, glândula salivar, traqueia, próstata, esôfago, laringe, omaso, língua, vesícula biliar, pâncreas, artéria pulmonar e pele. Os autores acreditam que a neoplasia tenha origem multicêntrica, sugerida pela proliferação de células mesenquimais indiferenciadas do sistema retículo endotelial.

Mais recentemente, no ano de 2012, Índia, foi relatado um caso de linfoma em uma búfala com cinco anos de idade (Chand et al., 2012). Os autores discutem como sendo um caso de leucose enzoótica bovina com base nos achados hematológicos e patológicos, mas não realizaram diagnóstico para o BLV, agente etiológico da doença nos bovinos. Adicionalmente, linfoma foi observado em uma búfala de 10 anos de idade, como um nódulo único de 20 cm de diâmetro na região da escápula do lado direito, o animal não apresentou nenhuma alteração hematológica e bioquímica (Kumar et al., 2012).

Foi encontrado na literatura apenas um relato de linfoma em búfalos fora da Índia, relatado na Venezuela (Vale-Echeto et al., 2009). Uma búfala apresentou linfoma multicêntrico, sendo discutido como leucose enzoótica bovina, mesmo sem os autores terem realizado diagnóstico para o BLV no animal enfermo.

2.3. Bovine leukemia virus (BLV)

O *Bovine leukemia virus* (BLV) ou vírus da leucemia bovina é um retrovírus do gênero *Deltaretrovirus*. O vírus infecta de forma natural animais da espécie bovina. Porém infecção experimental já foi realizada em coelho, galinha, rato, capivara, búfalo, macaco, caprino e ovino (Burny et al., 1988; Camargos et al., 2014).

O BLV é estreitamente relacionado ao *Human T-cell leukemia virus type 1* (HTLV-1), agente de leucemia de células T e desordens neurológicas em humanos (Aida et al., 2013).

2.3.1. Biologia

O BLV é um vírus envelopado e possui como material genético duas fitas de RNA, não complementares, sentido positivo no interior do capsídeo viral. A principal característica dos retrovírus é possuírem a enzima transcriptase reversa, fundamental na patogênese viral (Sagata et al., 1985). O vírus se liga aos receptores de membrana (ainda não conhecidos) nas células alvo e introduz o material genético no citoplasma celular. Pela ação da enzima transcriptase reversa as fitas de RNA são convertidas em DNA dupla fita, chamado DNA proviral. O DNA proviral entra no núcleo da célula e é integrado ao genoma do hospedeiro, pela ação da enzima integrase. As células alvo do BLV são os linfócitos B, porém linfócitos T, monócitos e granulócitos também podem ser infectados (Schwartz et al., 1994).

Uma vez integrado ao genoma o vírus utiliza os processos celulares de transcrição e tradução para produzir suas proteínas virais, montar novas partículas e sair das células por brotamento. Ao sair das células as partículas finalizam o processo de maturação por ação de proteases e tornam-se infecciosas (Burny et al., 1988). Não é comum a viremia nos casos de infecção pelo BLV e a transmissão é feita pelo mecanismo célula-célula (Johnston et al., 1996; Aida et al., 2013).

Estudos recentes têm demonstrado que a seleção do sítio de integração ao genoma do hospedeiro pelos retrovírus não é um evento randômico e pode influenciar na patogênese da doença. Por exemplo, na infecção pelo HTLV-1, o sítio de integração em pacientes humanos com HAM/TSP foi preferencialmente localizado em unidades de transcrição ativa do genoma quando comparado a portadores assintomáticos (Meekings et al., 2008). Porém, em um estudo realizado com o BLV, observou-se tendência de integração do vírus em regiões do DNA ricas em adenina e tiamina, mas não foi detectado um sítio específico de integração preferencial entre bovinos assintomáticos, com linfocitose persistente e com EBL, não associando sítio de integração com o curso da doença (Miyasaka et al., 2015).

O BLV possui genoma composto por 8720 pares de bases (pb), com três genes principais: *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais do capsídeo, o *pol* codifica as enzimas virais e o *env* as proteínas do envelope viral (Mamoun et al., 1990). O DNA proviral integrado no

genoma é flanqueado por longas regiões terminais repetidas (LTR), que são regiões virais regulatórias. Outro gene importante é o gene *tax*, que codifica a proteína Tax, muito estudada por ser um dos mecanismos importantes na patogênese para a transformação celular e oncogênese induzida em bovinos infectados pelo BLV e humanos infectados pelo HTLV-1 (Aida et al., 2013).

A proteína Tax provoca a transativação de genes virais e do hospedeiro envolvidos nos processos de crescimento e proliferação celular, interagindo com moléculas reguladoras do ciclo celular e vias de sinalização como NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), CREB (*cAMP response element-binding protein*), SRF (*serum response factor*) (Azran et al., 2004; Arainga et al., 2012; Aida et al., 2013)

A glicoproteína gp51 codificada pelo gene *env*, envolvida no processo de ligação e entrada do vírus na célula hospedeira, é altamente imunogênica e por isso utilizada em testes de diagnóstico sorológico (Matsumura et al., 2011). A proteína p24 codificada pelo gene *gag* também é utilizada com este fim, uma vez que essa proteína compõe a maior parte do capsídeo viral e induz forte resposta imune (Mammerickx et al., 1985; Dolz e Moreno, 1999; Gutierrez et al., 2009).

2.3.2. Sinais clínicos

A maior parte dos bovinos infectados pelo BLV são assintomáticos, não manifestando nenhuma alteração clínica ou hematológica, porém de 20 a 30% desenvolvem linfocitose persistente. Por outro lado, de 1 a 5% dos animais infectados desenvolvem linfomas, doença conhecida com leucose enzoótica bovina (EBL) (Ghysdael et al., 1984; Bartlett et al., 2013).

Os linfomas são multicêntricos podendo ser observados em diversos locais e órgãos o que provoca sinais clínicos variados. Os sinais clínicos mais observados são linfadenomegalia e emagrecimento progressivo. Quando as massas tumorais se localizam no canal medular pode-se observar sinais neurológicos pela compressão de nervos, exoftalmia é observada quando o tumor cresce no globo ocular e distúrbios digestivos são gerados pelas massas tumorais no abomaso e intestinos. Os animais evoluem para estados de caquexia e morte (Grimshaw et al., 1979).

2.3.3. Diagnóstico

As técnicas sorológicas são as mais utilizadas para diagnosticar a infecção pelo BLV. A imunodifusão em gel de ágar (IDGA) e os testes ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) são os testes diagnósticos aprovados pela OIE (World Organization for Animal Health) para o diagnóstico da EBL. A maioria desses ensaios baseiam-se na detecção de anticorpos anti-gp51. A IDGA é o teste padrão segundo a OIE, o teste possui alta especificidade, porém os testes de ELISA, com sensibilidade mais elevada, foram desenvolvidos para uso em amostras de soro e/ou leite (Gutierrez et al., 2009; Sorge et al., 2011).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional e em tempo real (qPCR), aliadas ao sequenciamento de nucleotídeos tem sido amplamente utilizados para a detecção de DNA proviral e estudo da variabilidade genética entre os vírus de diferentes regiões geográficas (Licursi et al., 2003; Jimba et al., 2012; Camargos et al., 2014).

2.3.4. Epidemiologia

O BLV é transmitido principalmente de forma horizontal via insetos hematófagos e fômites contaminados. O controle baseia-se no uso de materiais descartáveis durante procedimentos que podem promover a transmissão de sangue entre animais (descorna, palpação retal, tatuagem e vacinação), na identificação e segregação de animais positivos e alimentação dos bezerras com colostro e leite pasteurizado ou de doadoras negativas para o BLV, pois essa também é uma importante via de transmissão (Rodriguez et al., 2011).

A EBL apresenta distribuição mundial e a prevalência sorológica do BLV é alta nos rebanhos bovinos brasileiros, principalmente leiteiros. No estado do Pará, Molnár et al. (1999) encontraram uma ocorrência de 49,8% pela técnica de ELISA e 26% por IDGA em 721 amostras de soro sanguíneo. Em Botucatu, São Paulo, 1193 amostras foram avaliadas pela técnica de ELISA, os resultados indicam 52% de soropositividade (Megid et al., 2003). Em Goiás a soropositividade observada foi de 36% (Andrade e Almeida, 1991), em Minas Gerais 30% (Camargos et al., 2003), no Paraná 40,7% (Leuzzi Júnior et al., 2003), no Rio de Janeiro 53% (Romero e Rowe, 1981) e no Rio Grande do Sul 12% (Moraes et al., 1996).

Prejuízos econômicos devido a leucose enzoótica bovina são causados pela morte de animais com linfoma, condenação de carcaças em abatedouro e pela restrição na exportação de embriões provenientes de animais sorologicamente positivos para alguns países. A interferência na produção de leite e na saúde dos animais apresenta resultados conflitantes entre autores (Sorge et al., 2011; Erskine et al., 2012; Rajao et al., 2014).

2.3.5. BLV em búfalos

Poucos são os trabalhos que estudaram a presença do material genético e/ou de anticorpos contra o BLV em búfalos. Os dados são contraditórios, existindo trabalhos que não detectaram a infecção por BLV em bubalinos e outros que apontam o contrário.

Em 2000, no Paquistão, foi realizado um estudo para detectar a coinfeção do *Bovine immunodeficiency virus* (BIV) e BLV em búfalos e bovinos, por meio das técnicas de Western blot anti-p26 e IDGA anti-glicoproteína do envelope, respectivamente (Meas et al., 2000b). Nesse estudo foram avaliadas 370 amostras de soro de búfalos e 76 de bovinos. Para o BIV a frequência de positivos observada foi de 10,3% em búfalos e 15,8% em bovinos. As amostras positivas foram confirmadas por meio de nested PCR para a região V2 do gene *env* do BIV. Já para o BLV nenhuma amostra bovina foi positiva e apenas três (0,8%) amostras bubalinas foram positivas, porém este resultado não foi confirmado por teste molecular ou outro sorológico.

Ainda no ano de 2000, foi realizado um estudo em búfalos e bovinos no Camboja, semelhante ao realizado por Meas et al. (2000b). Em bovinos o BLV foi observado em 5,3% dos animais testados, porém nenhum búfalo foi sorologicamente positivo (n=42). Para o BIV foi observada ocorrência de 26,3% e 16,7% em bovinos e búfalos, respectivamente (Meas et al., 2000a). De forma semelhante, cento e trinta e quatro amostras de búfalos foram negativas para o BLV por meio da técnica de IDGA em Taiwan (Wang, 1991).

No Brasil, Molnar et al. (2000) avaliaram 568 amostras de soro de búfalos da região amazônica por meio de testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-gp51 do BLV. Pela técnica de IDGA, 24,6% das amostras foram positivas e por dois testes de ELISA indireto, com diferença apenas no conjugado, o primeiro utilizando como conjugado um anticorpo monoclonal anti-IgG1 bovina produzido em camundongo e outro um anti-IgG completo bovino, a frequência de positivos observada foi de 28,5 e 42,4%, respectivamente. Por outro lado, 234 amostras de búfalos, das quais 213 foram coletadas na região amazônica, tiveram resultados negativos para anticorpos contra o BLV (Romero et al., 1981).

Resultados negativos também foram obtidos em 685 amostras de soro bubalino do Brasil, pela técnica de IDGA contra a glicoproteína gp51 (Rajão et al., 2010). Entretanto, mais recentemente, em um estudo que avaliou a presença de anticorpos anti-BLV por IDGA, em 232 amostras de soro de bubalinos de corte criados no Maranhão, Brasil, observou-se 4,31% de animais reagentes (Chaves et al., 2012).

Apenas um trabalho pesquisou o BLV em bubalinos por meio de testes moleculares (Mingala et al., 2009). Os autores realizaram um estudo comparativo da resposta imune entre búfalos do tipo rio e do tipo pântano nas Filipinas. Por meio de uma nested PCR para a região LTR do BLV, avaliaram 272 amostras de DNA obtido de *buffy coat*, das quais 27,6% foram positivas. Nenhuma amostra foi sequenciada para confirmar o resultado da PCR.

Foi descrito na Venezuela, um caso de linfoma em uma búfala (Vale-Echeto et al., 2009). Os autores não realizaram nenhum teste diagnóstico sorológico ou molecular para apontar o BLV como o agente causador, mas com base em estudos anatomopatológicos discutem como sendo um caso de leucose enzoótica bovina. Adicionalmente, avaliaram 300 soros de animais do mesmo rebanho pelas técnicas de ELISA e IDGA, encontrando 2% de soropositividade.

2.4. Bovine immunodeficiency virus (BIV)

O *Bovine immunodeficiency virus* (BIV) ou vírus da imunodeficiência bovina é um retrovírus, da subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus*, geneticamente relacionado ao *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1). O BIV foi isolado pela primeira vez em 1969 de uma vaca com linfocitose persistente nos Estados Unidos, dando origem a estirpe R-29 (Van der Maaten et al., 1972). Os autores inocularam bezerros com a estirpe isolada os quais desenvolveram linfadenomegalia e linfocitose, concluindo que o BIV estava associado a uma reação do tipo linfoproliferativa.

2.4.1. Biologia

A constituição genética e replicação do BIV é semelhante ao descrito no item 2.3.1 para o BLV. As células alvos dos lentivírus são as células do sistema imune, particularmente monócitos e macrófagos, porém linfócitos também podem ser infectados. *In vitro* o BIV pode infectar células do tipo fibroblásticas induzindo a formação de sincícios e morte celular (Gonda et al., 1994).

Adicionalmente, infecção produtiva já foi obtida em culturas celulares de baço, cérebro, pulmão, plexo coroide, testículo, timo, rins e membrana sinovial. *In vivo* o BIV infecta monócitos e macrófagos (Corredor et al., 2010).

O DNA proviral do BIV possui 8960 pb e é composto pelos três genes principais *gag*, *pol* e *env*, flanqueados pelas regiões terminais longas repetidas (*LTR*). Existem genes acessórios com função regulatória, *vpw*, *vpy*, *vif*, *vat*, *rev*, e *tmx* dispostos e sobrepostos entre os genes *pol* e *env*. As principais proteínas regulatórias são Tat e Rev, a primeira regula a expressão viral e a segunda está envolvida no transporte do RNA viral do núcleo para o citoplasma da célula. O gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope viral, uma subunidade transmembrana (TM) gp45 e outra de superfície (SU) gp100. As proteínas do capsídeo e nucleocapsídeo são produtos do gene *gag*, cujas principais são p16 (matriz), p26 (capsídeo) e p7 ou p13 (nucleocapsídeo). E no gene *pol* são codificadas as enzimas virais: transcriptase reversa, integrase e protease (Battles et al., 1992; Gonda et al., 1994; Corredor et al., 2010).

2.4.2. Sinais clínicos

Embora o BIV tenha sido descoberto na década de 1960, ele ganhou maior importância a partir de 1983 com a descoberta do HIV-1 (Corredor et al., 2010), sendo um modelo para o estudo da AIDS. Os estudos sobre os efeitos do BIV nos bovinos têm demonstrado a presença de poucos sinais clínicos não associados a uma doença ou síndrome específica. Linfadenopatia, linfocitose, encefalite e emagrecimento são as observações comumente relatadas.

Um caso atípico da doença foi observado em um bezerro bovino de 11 meses de idade (Rovid et al., 1996). Durante um experimento sobre a patogenia da infecção pelo BIV, o animal desenvolveu linfadenomegalia, monocitose e morreu 206 dias após inoculação da estirpe R-29, com linfoma multicêntrico de células T.

2.4.3. Diagnóstico

A infecção pelo BIV gera a produção de anticorpos pelo sistema imune, de forma que a indução da imunidade humoral resulta na produção de altos títulos de anticorpos contra a proteína p26 do capsídeo viral (Whetstone et al., 1990) e contra a glicoproteína transmembrana do envelope gp45, que é mais duradoura do que a anterior (Abed e Archambault, 2000).

Não existe a definição de um diagnóstico padrão para identificar a infecção pelo BIV (Bhatia et al., 2013). A detecção de anticorpos contra o vírus tem sido realizada por meio de ensaios imunoenzimáticos como o Western Blot (Meas et al., 2004) e o ELISA (Bhatia et al., 2008). A detecção direta pode ser realizada por meio da pesquisa de DNA proviral utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a detecção de RNA viral por meio da transcrição reversa aliada a PCR (RT-PCR) (Brujeni et al., 2010).

2.4.4. Epidemiologia

O BIV pode ser transmitido por via transplacentária e de forma horizontal por meio do sangue e fluidos corporais. Anticorpos contra o vírus já foram detectados em bovinos na Europa, Ásia, Índia, Austrália, Nova Zelândia, América do Norte e América do Sul (Corredor et al., 2010).

A prevalência é variável de acordo com a região e tipo de rebanho. Valores entre 1,4% a 66% já foram relatados no mundo (Horzinek et al., 1991; Walder et al., 1995; Rola-Luszczak et al., 2011). No Brasil apenas um relato foi encontrado, mostrando uma ocorrência de 11,7% em bovinos do Rio Grande do Sul pela técnica de Western Blot (Meas et al., 2002). No estado de Minas Gerais a ocorrência por seminested PCR foi de 12,5% em bovinos da Zona da Mata e região central do estado (Rodrigues A.P.S., comunicação pessoal).

Em búfalos foi observado ocorrência de 16,7% do BIV no Camboja (Meas et al., 2000a) e 10,3% no Paquistão (Meas et al., 2000b). No estado do Pará foi observada ocorrência de 4,4% do DNA proviral do vírus em 607 amostras de sangue bubalino avaliadas por seminested PCR (Albernaz, 2014).

2.5. *Bovine herpesvirus 6 (BoHV-6)*

O *Bovine herpesvirus 6 (BoHV-6)*, inicialmente nomeado *Bovine lymphotropic herpesvirus (BLVH)*, foi descoberto em 1998 em amostras de linfoma de bovinos causados pelo BLV (Rovnak et al., 1998).

De acordo com a classificação do *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*, o BoHV-6 pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Gammaherpesvirinae* e gênero *Macavirus*, onde estão agrupados dois vírus causadores de doença linfoproliferativa – febre catarral maligna – em bovinos e ruminantes selvagens, respectivamente: *Ovine herpesvirus 2* e *Alcelaphine herpesvirus 1*.

O papel do BoHV-6 como agente causador de enfermidades não é definido. O vírus já foi detectado em bovinos saudáveis (Rovnak et al., 1998; Garigliany et al., 2013), bovinos com metrite crônica não responsiva a tratamento padrão com antibióticos (Cobb et al., 2006; Banks et al., 2008), feto bovino abortado (Gagnon et al., 2010) e em amostras de linfoma em bovinos (Rovnak et al., 1998). Existem poucos estudos sobre esse agente na literatura.

2.5.1. Biologia

Os herpesvírus são classificados em três subfamílias, *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Latência e reativação são as características mais importantes dos herpesvírus. Enquanto os alpha e betaherpesvirus provocam ciclo lítico em várias células e estabelecem latência em algumas específicas, como células nervosas, os gammaherpesvírus inicialmente estabelecem latência e a replicação lítica ocorre em poucas células (Ackermann, 2006).

Os gammaherpesvírus não replicam com facilidade em cultivos celulares, não sendo fáceis de serem estudados, de forma que a literatura ainda é confusa em relação ao tema (Ackermann, 2006). Não foi encontrado um estudo sobre a biologia do BoHV-6, será abordado neste tópico o que tem sido relatado para os gammaherpesvírus de forma mais abrangente.

O *Epstein Barr virus* (EBV) também chamado *Human herpesvirus 4* (HHV-4) é o gammaherpesvírus mais bem estudado. É um importante patógeno humano associado a tumores, em especial linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin e linfoma imunoblástico (Thorley-Lawson et al., 2013). Para a infecção, os gammaherpesvírus inicialmente estabelecem uma ligação inespecífica com a célula alvo (Ackermann, 2006). No caso do EBV este contato é completado pela glicoproteína gp350/220 do envelope, que utiliza como ligante o CD21 (Carel et al., 1990). Adicionalmente, um complexo envolvendo outras proteínas virais, gB, gL e gH é necessário para a fusão do vírus com a membrana celular possibilitando a translocação do EBV para o citoplasma. Os detalhes moleculares do processo de ligação, fusão e translocação não são bem conhecidos para os gammaherpesvírus de interesse veterinário (Ackermann, 2006).

Após a entrada, as partículas virais são transportadas ao longo dos microtúbulos até o poro nuclear. Os nucleocapsídeos se ligam ao poro nuclear e liberam o DNA no interior do núcleo celular onde ocorrerá o processo de latência (Ackermann, 2006).

A latência pode ocorrer antes ou após um ciclo de replicação. Para estabelecer latência o DNA viral assume a forma circular e se mantém no hospedeiro realizando pouca ou nenhuma expressão de proteínas dependendo do vírus. Proteínas expressas durante essa fase podem levar à transformação celular, como observado em linfócitos B infectados pelo EBV (Thorley-Lawson e Gross, 2004). Neste caso as principais proteínas envolvidas são EBNAs (proteínas nucleares associadas a latência) e LAMPs (proteínas de membrana associadas a latência) (Nonkwelo et al., 1997; Ackermann, 2006).

No ciclo lítico, ORFs (*Open Reading Frames*) são expressas durante três estágios: imediato, precoce e tardio. As proteínas expressas provocam transativação de genes, com a produção de proteínas e síntese do DNA do vírus que serão utilizados para a montagem de novas partículas virais, as quais saem da célula por meio de lise (Ackermann, 2006).

O sequenciamento completo do genoma do BoHV-6 identificou uma região do DNA viral, não presente em outros *Macavirus*, que codifica uma proteína (Bov2.b2) semelhante a ornitina decarboxilase celular (ODC) e seu inibidor AZI (*antizyme inhibitor*), enzimas envolvidas na biossíntese das poliaminas. As poliaminas são pequenas moléculas catiônicas que atuam em diversos processos celulares incluindo a proliferação. Os autores discutem sobre a possibilidade da Bov2.b2 afetar o ciclo celular associado a replicação viral (Jia et al., 2014).

2.5.2. Epidemiologia

Em 1998, ao utilizar uma PCR com primers degenerados, denominada pan-herpesvirus, para amplificar uma região do gene da polimerase dos herpesvírus em amostras de linfoma de bovino nos Estados Unidos, Rovnak et al. (1998) identificaram uma nova sequência de herpesvírus e nomearam como *Bovine lymphotropic herpesvirus* (BLVH), conhecido atualmente como BoHV-6. Os linfomas eram causados pelo BLV então os autores desenvolveram uma PCR para

diagnóstico do BoHV-6 avaliando a possibilidade desse vírus atuar como cofator na doença leucose enzoótica bovina.

Ao analisar 32 amostras de linfoma, todas positivas para o BLV, foi observado a presença do BoHV-6 em 62% delas. Para tentar demonstrar coinfeção entre BLV e BoHV-6 testou-se DNA de células mononucleares do sangue periférico de 101 bovinos adultos aparentemente saudáveis. O BoHV-6 foi detectado em 91% das amostras, sendo observado em 94% dos animais soropositivos para o BLV (n=63) e em 87% dos animais soronegativos pra o BLV (n=38).

Análise filogenética das sequências de DNA do BoHV-6 indicaram uma classificação como subfamília *Gammaherpesvirinae*, e agrupamento junto com os agentes da febre catarral maligna (*Alcelaphine herpesvirus 1* – AIHV-1 e *Ovine herpesvirus 2* – OvHV-2), na ocasião do gênero *Rhadinovirus*. Os autores sugeriram que o BoHV-6 estava ubiquamente distribuído em bovinos e que o papel deste vírus como cofator na indução de linfoma causado por BLV devia ser considerado (Rovnak et al., 1998).

Em 2005, foi relatada a presença do BoHV-6 na descarga vaginal de cinco vacas com endometrite crônica não responsiva a tratamento em uma propriedade leiteira no Reino Unido (Cobb et al., 2006). Os autores também isolaram desta descarga vaginal a bactéria *Arcanobacterium pyogenes* e discutem a interação desses dois agentes como causadores da doença, mas afirmaram que o papel do BoHV-6 como causador de enfermidade era incerto.

Novamente no Reino Unido, o BoHV-6, agora já classificado pelo ICTV como sendo do gênero *Macavirus* (Chmielewicz et al., 2001), foi identificado em bovinos provenientes de nove propriedades leiteiras (Banks et al., 2008). O vírus foi detectado em amostras de swab vaginal ou exsudato vaginal de vacas com metrite pós-parto não responsiva a tratamento padrão com antibióticos. Os autores encontraram outros agentes envolvidos e não avaliaram propriedades não afetadas pela doença e por isso indicaram a necessidade de outros estudos para avaliar o papel do BoHV-6 no desenvolvimento da metrite pós-parto não responsiva a tratamento.

Em um estudo retrospectivo de 53 casos de febre catarral maligna em bisões e 30 em bovinos nos Estados Unidos (Collins et al., 2000), os autores avaliaram a presença do BoHV-6 em tecidos parafinados para histopatologia, por meio da PCR desenvolvida por Rovnak et al. (1998). O BoHV-6 foi detectado em três amostras de bisões e uma de bovino. A presença do vírus também foi avaliada no *buffy coat* de 190 vacas aparentemente saudáveis, provenientes de quatro fazendas leiteiras do nordeste do Colorado, Estados Unidos. Em três dessas fazendas havia o histórico de casos de febre catarral maligna. Alta prevalência de animais positivos para o BoHV-6 foi observada, variando de 52 a 78,7% de acordo com as fazendas.

No ano de 2008 foi realizado um estudo em Quebec, Canadá, de 26 casos de aborto bovino (Gagnon et al., 2010). O BoHV-6 foi detectado em amostras de cérebro e linfonodo de um feto abortado e os órgãos coração, fígado, rins e baço foram negativos pela técnica de PCR pan-herpesvirus. Os autores também detectaram *Neospora caninum* nesse feto abortado, um importante agente etiológico de aborto em bovinos. Este foi o primeiro relato do BoHV-6 no Canadá e os autores deixaram claro que não era possível afirmar que o vírus desempenhava um papel como causa de aborto em bovinos.

Na Bélgica, em 2013, uma vaca da raça Belgian blue, 7 anos de idade, com histórico de anorexia, depressão, perda de peso e metrite purulenta não responsiva a antibiótico foi submetida a avaliação *post-mortem* (Garigliany et al., 2013). O exsudato vaginal e amostras de tecido uterino foram submetidas a uma PCR pan-herpesvirus e o BoHV-6 foi identificado nessas amostras.

Nenhum patógeno bacteriano foi isolado e as amostras foram negativas para o vírus da diarréia viral bovina (BVDV).

Recentemente, foi desenvolvida uma nested PCR e uma qPCR quantitativa para detecção do BoHV-6, através do gene que codifica a glicoproteína B (gB) (Kubiś et al., 2013). Foram avaliadas 92 amostras de DNA obtidas de sangue total de bovinos leiteiros e 68 de coágulo sanguíneo de cervídeos da Polônia. O vírus foi detectado em 64,1 e 73,9% das amostras bovinas pelas técnicas de nested PCR e qPCR, respectivamente. As amostras de cervídeos foram negativas em ambas as técnicas.

2.6. Referências Bibliográficas

Abed, Y.; Archambault, D. A viral transmembrane recombinant protein-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine immunodeficiency virus infection. *J Virol Methods*, v.85, n.1-2, p.109-116, 2000.

Abujamra, A. L.; Spanjaard, R. A.; Akinsheye, I., et al. Leukemia virus long terminal repeat activates NFkappaB pathway by a TLR3-dependent mechanism. *Virology*, v.345, n.2, p.390-403, 2006.

Ackermann, M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet Microbiol.*, v.113, n.3-4, p. 211-222, 2006.

Aida, Y.; Murakami, H.; Takahashi, M., et al. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol.*, v.4, p.328, 2013.

Albernaz, T. T. *Detecção molecular do vírus da imunodeficiência viral bovina em búfalos (Bubalus bubalis) no estado do Pará*. 2014. 52f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, Belém.

Allen, C. E.; Kelly, K. M.; Bollard, C. M. Pediatric Lymphomas and Histiocytic Disorders of Childhood. *Pediatr Clin North Am.*, v. 62, n. 1, p. 139-165, 2015.

Andrade, J. R. A.; Almeida, M. M. R. Prevalência da leucose enzoótica bovina na bacia leiteira de Goiânia, Goiás. *A hora veterinária*, v.10, n.60, p.49-53, 1991.

Arainga, M.; Takeda, E.; Aida, Y. Identification of bovine leukemia virus tax function associated with host cell transcription, signaling, stress response and immune response pathway by microarray-based gene expression analysis. *BMC Genomics*, v.13, p.121, 2012.

Azran, I.; Schavinsky-Khrapunsky, Y.; Aboud, M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology*, v.1, p.20, 2004.

Banks, M.; Ibata, G.; Murphy, A. M., et al. Bovine lymphotropic herpesvirus and non-responsive post-partum metritis in dairy herds in the UK. *Vet J.*, v.176, n.2, p.248-250, 2008.

Barbosa, J. D.; Da Silva, J. B.; Rangel, C. P., et al. Tuberculosis prevalence and risk factors for water buffalo in Para, Brazil. *Trop Anim Health Prod*, v.46, n.3, p.513-517, 2014.

Barbosa, J. D.; Oliveira, C. M. C.; Tokarnia, C. H., et al. Comparação da sensibilidade de bovinos e búfalos à intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Pesq Vet Bras.*, v.23, n.4, p.167-172, 2003.

- Bartlett, P. C.; Norby, B.; Byrem, T. M., et al. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci*, v.96, n.3, p.1591-1597, 2013.
- Bastianetto, E. Criação de búfalos no Brasil: situação e perspectiva. *Rev Bras Reprod Anim.*, v., n.6, p.98-103, 2009.
- Battles, J. K.; Hu, M. Y.; Rasmussen, L., et al. Immunological characterization of the gag gene products of bovine immunodeficiency virus. *J Virol.*, v.66, n.12, p.6868-6877, 1992.
- Beatty, J. Viral causes of feline lymphoma: retroviruses and beyond. *Vet J.*, v.201, n.2, p.174-180, 2014.
- Beatty, J. A.; Lawrence, C. E.; Callanan, J. J., et al. Feline immunodeficiency virus (FIV)-associated lymphoma: a potential role for immune dysfunction in tumorigenesis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v.65, n.2-4, p.309-322, 1998.
- Bernardes, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. *Rev Bras Reprod Anim.*, v.31, n.3, p.293-298, 2007.
- Bhatia, S.; Patil, S. S.; Sood, R. Bovine immunodeficiency virus: a lentiviral infection. *Indian J Virol.*, v.24, n.3, p.332-341, 2013.
- Bhatia, S.; Sood, R.; Bhatia, A. K., et al. Development of a capsid based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunodeficiency virus antibodies in cattle and buffalo serum. *J Virol Methods*, v.148, n.1-2, p.218-225, 2008.
- Bhattacharya, P. Lymphosarcoma in Indian buffaloes. *Bull Off Int Epizoot.*, v.68, n.1, p.149-150, 1967.
- Brasil. Produção da Pecuária Municipal. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. v.41, 2013.
- Brujeni, G. N.; Poorbazargani, T. T.; Nadin-Davis, S., et al. Bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus and their mixed infection in Iranian Holstein cattle. *J Infect Dev Ctries.*, v.4, n.9, p.576-579, 2010.
- Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.*, v.13, p. 1-27, 1970.
- Burny, A.; Cleuter, Y.; Kettmann, R., et al. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Vet Microbiol.*, v.17, n.3, p.197-218, 1988.
- Camargos, M. F.; Rajao, D. S.; Leite, R. C., et al. Genetic variation of bovine leukemia virus (BLV) after replication in cell culture and experimental animals. *Genet Mol Res.*, v.13, n.1, p.1717-1723, 2014.
- Camargos, M. F.; Stancek, D.; Lessa, L. M., et al. Development of a polymerase chain reaction and its comparison with agar gel immunodiffusion test in the detection of bovine leukemia virus infection. *Braz J Vet Res Anim Sci.*, v.40, n.5, p.341-348, 2003.
- Campo, E.; Swerdlow, S. H.; Harris, N. L., et al. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, v.117, n.19, p.5019-5032, 2011.

- Carel, J. C.; Myones, B. L.; Frazier, B., et al. Structural requirements for C3d,g/Epstein-Barr virus receptor (CR2/CD21) ligand binding, internalization, and viral infection. *J Biol Chem.*, v.265, n.21, p.12293-12299, 1990.
- Carvalho, N. A.; Soares, J. G.; Porto Filho, R. M., et al. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season. *Theriogenology*, v.79, n.3, p.423-428, 2013.
- Castillo, J. J.; Reagan, J. L.; Bishop, K. D., et al. Viral lymphomagenesis: from pathophysiology to the rationale for novel therapies. *Br J Haematol.*, v.165, n.3, p.300-315, 2014.
- Catalan-Soares, B.; Carneiro-Proietti, A. B.; Proietti, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saude Publica*, v.21, n.3, p.926-931, 2005.
- Chand, N.; Deshmukh, S.; Banga, H. S., et al. Bovine lymphosarcoma in a buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet Pract.*, v.13, n.1, p.114, 2012.
- Chaves, N. P.; Bezerra, D. C.; Santos, L. S. d., et al. Intercorrência entre leucose enzoótica e brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em sistema de produção extensivo. *Pesq Vet Bras.*, v.32, p.131-134, 2012.
- Chmielewicz, B.; Goltz, M.; Ehlers, B. Detection and multigenic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats. *Virus Res.*, v.75, n.1, p.87-94, 2001.
- Choubisa, S. L.; Jaroli, V. J. Gastrointestinal parasitic infection in diverse species of domestic ruminants inhabiting tribal rural areas of southern Rajasthan, India. *J Parasit Dis.*, v.37, n.2, p.271-275, 2013.
- Cobb, S. P.; Banks, M.; Russell, C., et al. Bovine lymphotropic herpesvirus in a UK dairy herd. *Vet Rec.*, v.158, n.23, p.807-808, 2006.
- Collins, J. K.; Bruns, C.; Vermedahl, T. L., et al. Malignant catarrhal fever: polymerase chain reaction survey for ovine herpesvirus 2 and other persistent herpesvirus and retrovirus infections of dairy cattle and bison. *J Vet Diagn Invest.*, v.12, n.5, p.406-411, 2000.
- Corredor, A. G.; St-Louis, M. C.; Archambault, D. Molecular and biological aspects of the bovine immunodeficiency virus. *Curr HIV Res.*, v.8, n.1, p.2-13, 2010.
- Cotter, S. M.; Hardy, W. D., Jr.; Essex, M. Association of feline leukemia virus with lymphosarcoma and other disorders in the cat. *J Am Vet Med Assoc.*, v.166, n.5, p.449-454, 1975.
- Da Silva, J. B.; Rangel, C. P.; da Fonseca, A. H., et al. Serological survey and risk factors for brucellosis in water buffaloes in the state of Para, Brazil. *Trop Anim Health Prod.*, v.46, n.2, p.385-389, 2014.
- De Noronha, A. C.; Starke-Buzetti, W. A.; Duszynski, D. W. *Eimeria* spp. in Brazilian water buffalo. *J Parasitol.*, v.95, n.1, p.231-234, 2009.
- De Oliveira, C. H. S.; Barbosa, J. D.; Oliveira, C. M. C., et al. Hepatic photosensitization in buffaloes intoxicated by *Brachiaria decumbens* in Minas Gerais state, Brazil. *Toxicon*, v.73, p.121-129, 2013.
- De Tullio, G.; De Fazio, V.; Sgherza, N., et al. Challenges and opportunities of microRNAs in lymphomas. *Molecules*, v.19, n.9, p.14723-14781, 2014.

- Dolz, G.; Moreno, E. Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting for the detection of BLV antibodies. *Zentralbl Veterinarmed B.*, v.46, n.8, p.551-558, 1999.
- Erskine, R. J.; Bartlett, P. C.; Byrem, T. M., et al. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci.*, v.95, n.2, p.727-734, 2012.
- Forman, L. W.; Pal-Ghosh, R.; Spanjaard, R. A., et al. Identification of LTR-specific small non-coding RNA in FeLV infected cells. *FEBS Lett*, v.583, n.8, p.1386-1390, 2009.
- Gagnon, C. A.; Allam, O.; Drolet, R., et al. Quebec: Detection of bovine lymphotropic herpesvirus DNA in tissues of a bovine aborted fetus. *Can Vet J.*, v.51, n.9, p.1021-1022, 2010.
- Garigliany, M.-M.; Bayrou, C.; Cassart, D., et al. Bovine lymphotropic herpesvirus detected in Belgium. *Vet Rec.*, v.172, n.20, p.535-536, 2013.
- Ghysdael, J.; Bruck, C.; Kettmann, R., et al. Bovine leukemia virus. *Curr Top Microbiol Immunol.*, v.112, p.1-19, 1984.
- Gonda, M. A.; Luther, D. G.; Fong, S. E., et al. Bovine immunodeficiency virus: molecular biology and virus-host interactions. *Virus Res.*, v.32, n.2, p.155-181, 1994.
- Grimshaw, W. T.; Wiseman, A.; Petrie, L., et al. Bovine leucosis (lymphosarcoma): a clinical study of 60 pathologically confirmed cases. *Vet Rec.*, v.105, n.12, p.267-272, 1979.
- Gupta, P. P.; Singh, B.; Gill, B. S. Some uncommon neoplasms of Indian water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Zentralbl Veterinarmed A.*, v.24, n.6, p.511-519, 1977.
- Gutierrez, G.; Alvarez, I.; Fondevila, N., et al. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet Microbiol.*, v.137, n.3-4, p.224-234, 2009.
- Hartmann, K. Clinical aspects of feline retroviruses: a review. *Viruses*, v.4, n.11, p.2684-2710, 2012.
- Horzinek, M.; Keldermans, L.; Stuurman, T., et al. Bovine immunodeficiency virus: immunochemical characterization and serological survey. *J Gen Virol.*, v.72 (Pt 12), p.2923-2928, 1991.
- Intlekofer, A. M.; Younes, A. Precision therapy for lymphoma--current state and future directions. *Nat Rev Clin Oncol.*, v.11, n.10, p.585-596, 2014.
- Jia, J.; Delhon, G.; Tulman, E. R., et al. Novel gammaherpesvirus functions encoded by bovine herpesvirus 6 (bovine lymphotropic virus). *J Gen Virol.*, v.95, n.Pt 8, p.1790-1798, 2014.
- Jimba, M.; Takeshima, S. N.; Murakami, H., et al. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC Vet Res.*, v.8, p.167, 2012.
- Johnston, E. R.; Powers, M. A.; Kidd, L. C., et al. Peripheral blood mononuclear cells from sheep infected with a variant of bovine leukemia virus synthesize envelope glycoproteins but fail to induce syncytia in culture. *J Virol.*, v.70, n.9, p.6296-6303, 1996.
- Jorge, A. M. Produção de carne bubalina. *Rev Bras Reprod Anim.*, v.29, n.2, p.84-95, 2005.
- Kierstein, G.; Vallinoto, M.; Silva, A., et al. Analysis of mitochondrial D-loop region casts new light on domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) phylogeny. *Mol Phylogenet Evol.*, v.30, n.2, p.308-324, 2004.

- Kubiś, P.; Materniak, M.; Kuźmak, J. Comparison of nested PCR and qPCR for the detection and quantitation of BoHV6 DNA. *J Virol Methods*, v.194, n.1-2, p.94-101, 2013.
- Kumar, R. V. S.; Veena, P.; Dhanalakshmi, N., et al. Lymphosarcoma in a buffalo: a case report. *Buffalo Bulletin*, v.31, n.1, p.17-18, 2012.
- Leuzzi Júnior, L. A.; Guimarães Júnior, J. S.; Freire, R. 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. *Rev Bras Ciênc Vet.*, v.10, n.2, p.93-98, 2003.
- Licursi, M.; Inoshima, Y.; Wu, D., et al. Provirus variants of bovine leukemia virus in naturally infected cattle from Argentina and Japan. *Vet Microbiol.*, v.96, n.1, p.17-23, 2003.
- Luz, P. A. C.; Andrighetto, C. Características da carne bubalina e benefícios da maturação sobre a sua qualidade. *Rev Acad Ciênc Agrár Ambient.*, v.11, n.4, p.413-420, 2013.
- Macedo, M. P.; Wechsler, F. S.; Ramos, A. A., et al. Composição Físico-Química e Produção do Leite de Búfalas da Raça Mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo. *Rev Bras Zootec*, v.30, n.3, p.1084-1088, 2001.
- Madhanmohan, M.; Yuvaraj, S.; Nagendrakumar, S. B., et al. Transmission of foot-and-mouth disease virus from experimentally infected Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) to in-contact naive and vaccinated Indian buffalo and cattle. *Vaccine*, v.32, n.39, p.5125-5130, 2014.
- Magrath, I. Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma. *Br J Haematol.*, v.156, n.6, p.744-756, 2012.
- Malhado, C. H. M.; Ramos, A. A.; Carneiro, P. L. S., et al. Parâmetros e tendências da produção de leite em bubalinos da raça Murrah no Brasil. *R Bras Zootec.*, v.36, n.2, p.376-379, 2007.
- Mammerickx, M.; Portetelle, D.; Burny, A. The diagnosis of enzootic bovine leukosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, v.8, n.3-4, p.305-309, 1985.
- Mamoun, R. Z.; Morisson, M.; Rebeyrotte, N., et al. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. *J Virol.*, v.64, n.9, p.4180-4188, 1990.
- Matsumura, K.; Inoue, E.; Osawa, Y., et al. Molecular epidemiology of bovine leukemia virus associated with enzootic bovine leukosis in Japan. *Virus Res.*, v.155, n.1, p.343-348, 2011.
- Meas, S.; Nakayama, M.; Usui, T., et al. Evidence for bovine immunodeficiency virus infection in cattle in Zambia. *Jpn J Vet Res.*, v.52, n.1, p.3-8, 2004.
- Meas, S.; Ohashi, K.; Tum, S., et al. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *J Vet Med Sci.*, v.62, n.7, p.779-781, 2000a.
- Meas, S.; Ruas, J.; Farias, N. A., et al. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency virus in Brazilian cattle. *Jpn J Vet Res.*, v.50, n.1, p.9-16, 2002.
- Meas, S.; Seto, J.; Sugimoto, C., et al. Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *J Vet Med Sci.*, v.62, n.3, p.329-331, 2000b.

- Meekings, K. N.; Leipzig, J.; Bushman, F. D., et al. HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP. *PLoS Pathog.*, v.4, n.3, p.e1000027, 2008.
- Megid, J.; Nozaki, C. N.; Kuroda, R. B. S., et al. Ocorrência de leucose enzoótica bovina na microrregião da Serra de Botucatu. *Arq Bras Med Vet Zootec.*, v.55, p.645-646, 2003.
- Mingala, C. N.; Konnai, S.; Cruz, L. C., et al. Comparative moleculo-immunological analysis of swamp- and riverine-type water buffaloes responses. *Cytokine*, v.46, n.2, p.273-282, 2009.
- Miyasaka, T.; Oguma, K.; Sentsui, H. Distribution and characteristics of bovine leukemia virus integration sites in the host genome at three different clinical stages of infection. *Arch Virol.*, v.160, n.1, p.39-46, 2015.
- Moaeen-ud-Din, M.; Bilal, G. Sequence diversity and molecular evolutionary rates between buffalo and cattle. *J Anim Breed Genet.*, v.132, n.1, p.74-84, 2015.
- Molnár, É.; Molnár, L.; Dias, H. T., et al. Ocorrência da leucose enzoótica dos bovinos no Estado do Pará, Brasil. *Pesq Vet Bras.*, v.19, p.7-11, 1999.
- Molnar, E.; Molnar, L.; Guedes, V. T., et al. Naturally occurring bovine leukosis virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Brazil. *Vet Rec.*, v.146, n.24, p.705-706, 2000.
- Moraes, M. P.; Weiblen, R.; Flores, E. F., et al. Levantamento sorológico da infecção pelo vírus da leucose bovina nos rebanhos leiteiros do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciênc Rural*, v.26, p.257-262, 1996.
- Murphy, S. B. Classification, staging and end results of treatment of childhood non-Hodgkin's lymphomas: dissimilarities from lymphomas in adults. *Semin Oncol.*, v.7, n.3, p.332-339, 1980.
- Nonkwelo, C.; Ruf, I. K.; Sample, J. The Epstein-Barr virus EBNA-1 promoter Qp requires an initiator-like element. *J Virol.*, v.71, n.1, p.354-361, 1997.
- Oliveira, A. L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. *Rev Bras Reprod Anim.*, v.29, n.2, p.122-134, 2005.
- Osman, K. M.; El-Enbaawy, M. I.; Ezzeldeen, N. A., et al. Mastitis in dairy buffalo and cattle in Egypt due to *Clostridium perfringens*: prevalence, incidence, risk factors and costs. *Rev Sci Tech.*, v.28, n.3, p.975-986, 2009.
- Panziera, W.; Bianchi, R. M.; Galiza, G. J. N., et al. Aspectos epidemiológicos, clínicos e anatomopatológicos do linfoma em bovinos: 128 casos (1965-2013). *Pesq Vet Bras.*, v.34, p.856-864, 2014.
- Pasqualucci, L. The genetic basis of diffuse large B-cell lymphoma. *Curr Opin Hematol.*, v.20, n.4, p.336-344, 2013.
- Rajão, D. S.; Bastianetto, E.; Reis, J. P. K., et al. Estudo da infecção pelo vírus da leucose bovina em bubalinos (*Bubalus bubalis*) no estado de Minas Gerais. *Rev Bras Med Vet.*, v.32, n.1, p.42-45, 2010.
- Rajao, D. S.; Heinemann, M. B.; Reis, J. K., 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.891-900, 2014.

- Rodriguez, S. M.; Florins, A.; Gillet, N., et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses*, v.3, n.7, p.1210-1248, 2011.
- Rola-Luszczak, M.; Kozaczynska, B.; Kuzmak, J. Serological survey for bovine immunodeficiency virus in dairy cattle from Poland. *Pol J Vet Sci.*, v.14, n.4, p.579-583, 2011.
- Romero, C. H.; Aguiar, A. A.; Zanocchi, H. G., et al. Susceptibility of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) to enzootic bovine leukosis virus. *Pesq Vet Bras.*, v.1, p.137-140, 1981.
- Romero, C. H.; Rowe, C. A. Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. *Trop Anim Health Prod.*, v.13, n.2, p.107-111, 1981.
- Rovid, A. H.; Carpenter, S.; Miller, L. D., et al. An atypical T-cell lymphosarcoma in a calf with bovine immunodeficiency-like virus infection. *Vet Pathol.*, v.33, n.4, p.457-459, 1996.
- Rovnak, J.; Quackenbush, S. L.; Reyes, R. A., et al. Detection of a novel bovine lymphotropic herpesvirus. *J Virol.*, v.72, n.5, p.4237-4242, 1998.
- Rowe, M.; Fitzsimmons, L.; Bell, A. I. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *Chin J Cancer*, v.33, n.12, p.609-619, 2014.
- Rozza, D. B.; Corrêa, A. M. R.; Leal, J. S., et al. Intoxicação experimental por monensina em búfalos e bovinos. *Pesq Vet Bras.*, v.27, p.172-178, 2007.
- Rozza, D. B.; Vervuert, I.; Kamphues, J., et al. Monensin toxicosis in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *J Vet Diagn Invest.*, v.18, n.5, p.494-496, 2006.
- Sagata, N.; Yasunaga, T.; Tsuzuku-Kawamura, J., et al. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.82, n.3, p.677-681, 1985.
- Scherf, B. D. (Ed). World watch list for domestic animal diversity. 3.ed. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2000. 726p.
- Schmiedt, C. W.; Grimes, J. A.; Holzman, G., et al. Incidence and risk factors for development of malignant neoplasia after feline renal transplantation and cyclosporine-based immunosuppression. *Vet Comp Oncol.*, v.7, n.1, p.45-53, 2009.
- Schwartz, I.; Bensaid, A.; Polack, B., et al. In vivo leukocyte tropism of bovine leukemia virus in sheep and cattle. *J Virol.*, v.68, n.7, p.4589-4596, 1994.
- Shankland, K. R.; Armitage, J. O.; Hancock, B. W. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, v.380, n.9844, p.848-857, 2012.
- Shelton, G. H.; Grant, C. K.; Cotter, S. M., et al. Feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus infections and their relationships to lymphoid malignancies in cats: a retrospective study (1968-1988). *J Acquir Immune Defic Syndr.*, v.3, n.6, p.623-630, 1990.
- Singh, B.; Singh, K. P.; Parihar, N. S., et al. Clinicopathological studies on lymphosarcoma in Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Zentralbl Veterinarmed A.*, v.26, n.6, p.468-481, 1979.
- Singh, B.; Singh, K. P.; Parihar, N. S., et al. Lymphosarcomatous involvement of reproductive and endocrine organs in Indian buffalo. *Zentralbl Veterinarmed A.*, v.27, n.7, p.583-592, 1980.
- Singh, C. M. Lymphosarcoma in Indian buffaloes. *Bibl Haematol.*, v.30, p.237-243, 1968.

- Singh, C. M.; Singh, B.; Parihar, N. S. Pulmonary involvement in lymphosarcoma of Indian buffaloes. *Bibl Haematol.*, v.39, p.220-227, 1973.
- Sorge, U. S.; Lissemore, K.; Cantin, R., et al. Short communication: Milk ELISA status for bovine leukosis virus infection is not associated with milk production in dairy cows. *J Dairy Sci.*, v.94, n.10, p.5062-5064, 2011.
- Thenoz, M.; Vernin, C.; Mortada, H., et al. HTLV-1-infected CD4+ T-cells display alternative exon usages that culminate in adult T-cell leukemia. *Retrovirology*, v.11, n.1, p.119, 2014.
- Thorley-Lawson, D. A.; Gross, A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med.*, v.350, n.13, p.1328-1337, 2004.
- Thorley-Lawson, D. A.; Hawkins, J. B.; Tracy, S. I., et al. The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol.*, v.3, n.3, p.227-232, 2013.
- Tsatsanis, C.; Fulton, R.; Nishigaki, K., et al. Genetic determinants of feline leukemia virus-induced lymphoid tumors: patterns of proviral insertion and gene rearrangement. *J Virol.*, v.68, n.12, p.8296-8303, 1994.
- Tsonev, P.; Kamburov, G.; G'L'binov, G. [Interbreed and interspecies variation in the occurrence of subclinical mastitis in cows and buffaloes]. *Vet Med Nauki.*, v.12, n.9, p.37-40, 1975.
- Vale-Echeto, O. E.; Montiel-Urdaneta, N.; Simoes, D., et al. Linfoma multicéntrico o linfosarcoma multicéntrico en Búfalo de agua (*Bubalus bubalis*): Estudio Anatomopatológico. Reporte de un caso. *Revista Científica*, v.19, p.257-263, 2009.
- Van der Maaten, M. J.; Boothe, A. D.; Seger, C. L. Isolation of a virus from cattle with persistent lymphocytosis. *J Natl Cancer Inst.*, v.49, n.6, p.1649-1657, 1972.
- Vockerodt, M.; Yap, L. F.; Shannon-Lowe, C., et al. The Epstein-Barr Virus and the Pathogenesis of Lymphoma. *J Pathol.*, v.235, n.2, p.312-322, 2015.
- Walder, R.; Kalvatchev, Z.; Tobin, G. J., et al. Possible role of bovine immunodeficiency virus in bovine paraplegic syndrome: evidence from immunochemical, virological and seroprevalence studies. *Res Virol.*, v.146, n.5, p.313-323, 1995.
- Wang, C. T. Bovine leukemia virus infection in Taiwan: epidemiological study. *J Vet Med Sci*, v. 53, n. 3, p. 395-398, 1991.
- Whetstone, C. A.; VanDerMaaten, M. J.; Black, J. W. Humoral immune response to the bovine immunodeficiency-like virus in experimentally and naturally infected cattle. *J Virol*, v. 64, n. 7, p. 3557-3561, 1990.
- Yung, L.; Linch, D. Hodgkin's lymphoma. *Lancet*, v. 361, n. 9361, p. 943-951, 2003.
- Zane, L.; Sibon, D.; Jeannin, L., et al. Tax gene expression and cell cycling but not cell death are selected during HTLV-1 infection in vivo. *Retrovirology*, v. 7, n., p. 17, 2010.

3. CAPÍTULO 1: Estudo da infecção pelo *Bovine leukemia virus* (BLV) em bubalinos da região amazônica e sudeste do Brasil

3.1. Resumo

A leucose enzoótica bovina é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Bovine leukemia virus* (BLV), onde a maior parte dos bovinos infectados são assintomáticos, de 1 a 5% desenvolvem linfoma e de 20 a 30 % apresentam linfocitose persistente. O vírus ocorre de maneira natural na espécie bovina e de forma experimental em búfalos, ovelhas, capivaras e coelhos. Nos bubalinos alguns autores atribuem à ocorrência de linfoma a infecção pelo BLV, porém os dados são escassos e contraditórios. Nesse contexto o objetivo do estudo foi avaliar a presença do BLV em amostras de soro e sangue total de bubalinos da região amazônica e sudeste do Brasil. 315 amostras de soro de búfalos foram testadas por meio das técnicas de IDGA e ELISA comercial (ELISA-gp51) para detecção de anticorpos anti-gp51 do BLV cujos os resultados foram negativos. Essas amostras também foram avaliadas para a detecção de anticorpos contra a partícula viral inteira do BLV através de um teste de ELISA comercial (ELISA-BLV) sendo encontrado 24,44% (77/315) de soropositividade e 0,63% (2/315) de amostras inconclusivas. Por outro lado, todas as amostras de sangue dos búfalos estudados foram negativas em duas PCRs para a detecção de DNA proviral das regiões do gene *tax* e *env* do BLV. Esses resultados sugerem a ocorrência de resultados falso positivo no ELISA-BLV. Adicionalmente, uma amostra de linfoma de um bubalino teve resultado negativo nas duas PCRs utilizadas. Não foi detectada a presença de BLV em bubalinos da região amazônica ou de Minas Gerais, Brasil. Ao utilizar testes de ELISA não padronizados para bubalinos, deve-se levar em consideração a ocorrência de resultados falso positivos. A ocorrência de linfoma em búfalos parece não estar associada a infecção pelo BLV e a etiologia da doença bem como sua patogenia devem ser melhor investigadas.

3.2. Introdução

O *Bovine leukemia virus* (BLV), agente etiológico da leucose enzoótica bovina (LEB), é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae* gênero *Deltaretrovirus*, que induz infecção crônica em bovinos, os quais podem permanecer assintomáticos por vários anos (1 a 8 anos) atuando como fonte de infecção. Cerca de 20 a 30 % dos animais infectados desenvolvem linfocitose persistente, pela expansão policlonal de linfócitos B e uma pequena porcentagem (1 a 5%) desenvolve linfoma, a forma clínica fatal da enfermidade (Ghysdael et al., 1984; Bartlett et al., 2013).

Os testes de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) são os testes de referência pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico da EBL. A IDGA é a técnica padrão, mas testes de ELISA têm sido desenvolvidos por apresentarem alta sensibilidade. O diagnóstico baseia-se, principalmente, na detecção de anticorpos contra a glicoproteína gp51 do envelope viral codificada pelo gene *env* e contra a proteína p24 do core viral, codificada pelo gene *gag* (Mammerickx et al., 1985; Dolz e Moreno, 1999; Gutierrez et al., 2009).

A maioria das doenças infecciosas que acometem bubalinos coincide com aquelas já descritas para a espécie bovina, porém poucos são os trabalhos que pesquisaram a ocorrência natural do BLV em búfalos e os dados são escassos e contraditórios. Alguns trabalhos pesquisaram anticorpos anti-gp51 do BLV em bubalinos por meio de IDGA ou ELISA em Taiwan (Wang, 1991), Camboja (Meas et al., 2000a) e Brasil (Romero et al., 1981; Rajão et al., 2010), mas nenhum animal soropositivo foi detectado. Outros autores detectaram 0,8% de soropositividade (Meas et al., 2000b) no Paquistão, 24,6% (Molnar et al., 2000) e 4,31% (Chaves et al., 2012) no Brasil.

Um caso de linfoma multicêntrico em uma búfala foi descrito na Venezuela, mas não foi confirmada a infecção pelo BLV por diagnóstico sorológico ou molecular. Os autores relataram 2% de soropositividade por IDGA e ELISA no rebanho do qual o animal fazia parte (Vale-Echeto et al., 2009).

Existe apenas um relato de pesquisa do BLV em búfalos utilizando a técnica de PCR. Os autores desenvolveram uma nested PCR para a região LTR do vírus e detectaram 27,6% de amostras positivas em um estudo que comparou a resposta molecular e imunológica entre búfalos do tipo rio e pântano nas Filipinas (Mingala et al., 2009). Em nenhuma amostra foi feito o sequenciamento de nucleotídeos e não existe nenhuma sequência de BLV derivada de bubalinos no banco de dados GenBank.

No estado do Pará, região amazônica, tem sido observado búfalos apresentando doença neoplásica semelhante a leucose enzoótica bovina (dados não publicados). O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença do DNA proviral e anticorpos anti-BLV em búfalos de rebanhos, com e sem o histórico de linfoma, da região amazônica e sudeste do Brasil.

3.3. Material e métodos

Amostras

As amostras foram coletadas ao longo dos anos de 2011 e 2012 através de venopunção da jugular em sistema de coleta a vácuo em tubo com e sem anticoagulante, sendo provenientes de sete propriedades no estado do Pará, norte do Brasil (propriedades A-PA, B-PA, C-PA, D-PA, E-PA, F-PA, G-PA) e uma propriedade no estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil (propriedade H-MG). No estado do Pará as propriedades pertenciam aos municípios de Cachoeira do Arari (E-PA) e Soure (D-PA e G-PA) na Ilha de Marajó, Castanhal (A-PA), Ipixuna do Pará (C-PA), Abaetetuba (F-PA) e Vigia (B-PA); no estado de Minas Gerais a propriedade localizava-se no município de Pedro Leopoldo (H-MG) (Figura 1).

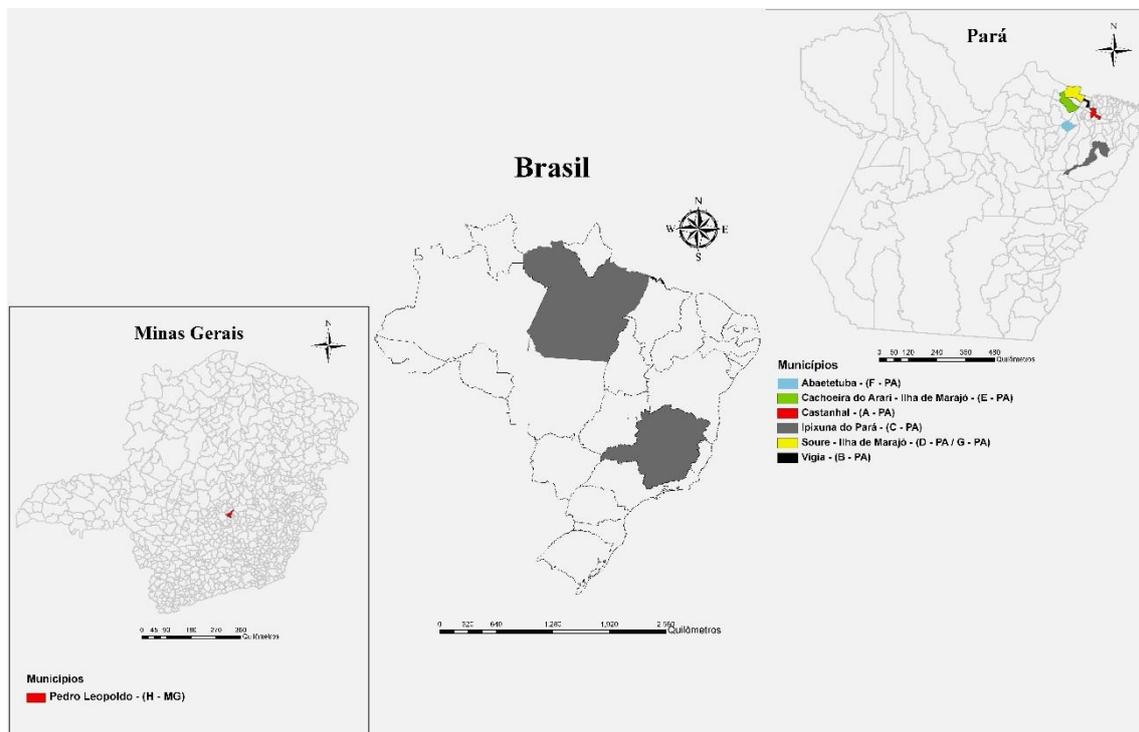


Figura 1. Mapa do Brasil mostrando os estados e municípios de onde foram coletadas as amostras de sangue e soro de bubalinos das raças Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi para estudo da infecção pelo BLV. “()” código das propriedades coletadas.

Foram coletadas 21 amostras de sangue total e soro sanguíneo de bubalinos, aparentemente saudáveis, do estado de Minas Gerais e 294 amostras de bubalinos do estado do Pará, dos quais 11 animais faziam parte de um rebanho com histórico da ocorrência de linfoma (propriedade A-PA) ainda não caracterizado, totalizando 315 amostras.

As propriedades eram de criação do tipo mista, onde o rebanho era explorado para corte e leite. Os animais eram das raças Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi, de ambos os sexos, com idade variando entre 2 a 10 anos.

Todos os procedimentos que envolveram a manipulação de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo de nº 133/2012 (Anexo I).

Imunodifusão em gel de Ágar (IDGA)

As amostras de soro sanguíneo foram submetidas à pesquisa de anticorpos anti-gp51 com kit comercial para diagnóstico da leucose enzoótica bovina (TECPAR, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Todas as amostras de soro foram testadas com dois kits comerciais de ELISA. Um para a detecção de anticorpos anti-gp51 (ELISA-gp51) com o kit comercial Enzootic Bovine Leukosis Virus (BLV) gp51 Antibody Test Kit (IDEXX Laboratories, EUA), e outro para a detecção de anticorpos anti-BLV (ELISA-BLV), Chekit Leucose-serum (IDEXX Laboratories, EUA). Ambos os testes foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de sangue total foram submetidas a duas PCRs desenvolvidas “in house” para a detecção de DNA proviral para a região do gene *env* (gp51) e do gene *tax* do BLV. O DNA genômico foi extraído do sangue total utilizando o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha) e utilizado como *template* para as duas PCRs. Como controle positivo das reações foi utilizado DNA obtido a partir de células FLK (Fetal Lamb Kidney) persistentemente infectadas com BLV, e como controle negativo água ultrapura.

A PCR para a gp51 foi desenvolvida para amplificar um fragmento de 568 pb utilizando os primers BLV-gp51-F 5'TCACCTTTCTGTGCCAAGTCT3' e BLV-gp51-R 5'TGGTGTAAACGAGGACGTGT3', desenhados no programa Primer3 v.0.4.0 (Untergasser et al., 2007). A reação foi composta de 1U de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, USA), 1x de 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP mix (Invitrogen, USA), 10 pmoles de cada primer, 300 ng de DNA e água ultrapura q.s.p. 25uL. Os ciclos para amplificação foram constituídos de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 51°C por 30s e extensão a 72°C por 30s, seguido de extensão final a 72°C por 5 minutos.

A PCR para o gene *tax* foi desenvolvida para amplificar um fragmento de 697 pb utilizando os primers BLV-tax-F 5'CGAGACCCACCGTATCAACT3' e BLV-tax-R 5'TTCGGACCAGGTTAGCGTAG3'. As condições de reação e ciclo foram as mesmas da PCR anterior, exceto para a temperatura de anelamento que foi ajustada para 55°C.

Os produtos de ambas as PCRs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular de 100 pb (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, EUA, número de catálogo 15628-019) foi utilizado em cada uma das corridas eletroforéticas.

Amostra de tecido tumoral (linfoma) de um bubalino pertencente a propriedade A-PA, localizada no município de Castanhal, estado do Pará, foi extraída utilizando o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha) para pesquisa de DNA proviral do BLV, como descrito acima.

Para avaliar a qualidade e eficiência da extração do DNA, todas as amostras foram submetidas a uma PCR para amplificação do gene constitutivo GAPDH (Pinheiro de Oliveira et al., 2013).

3.4. Resultados

Todas as amostras de soro avaliadas (n=315) foram negativas no teste de IDGA e no ELISA para a detecção de anticorpos anti-gp51 do BLV (ELISA-gp51). Por outro lado, 24,44% (77/315) dessas amostras foram positivas e 0,63% (2/315) inconclusivas no ELISA-BLV (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação dos testes de diagnóstico sorológico para o *Bovine leukemia virus* (BLV) em amostras de soro de bubalinos, por meio das técnicas de IDGA, ELISA para a glicoproteína gp51 (ELISA-gp51) e ELISA para a partícula viral inteira (ELISA-BLV).

Ensaio	Positivos/amostras (%)	Inconclusivos/amostras (%)
IDGA	0/315 (0%)	0/315 (0%)
ELISA-gp51	0/315 (0%)	0/315 (0%)
ELISA-BLV	77/315 (24,44%)	2/315 (0,63%)

A frequência de propriedades com búfalos positivos de acordo com os resultados obtidos com o ELISA-BLV foi de 75% (6/8), sendo observados animais positivos em cinco das sete propriedades avaliadas do estado do Pará (A-PA, C-PA, D-PA, F-PA e G-PA) e em uma do estado de Minas Gerais (H-MG). As amostras de soro com resultado inconclusivo foram provenientes de uma propriedade do estado Pará (C-PA).

Entretanto, todas as amostras de DNA bubalino obtido a partir do sangue total, testadas nas duas PCRs para a detecção de ácidos nucleicos do BLV, uma para a região *env* (PCR-gp51) e uma para a região *tax* (PCR-tax) apresentaram resultados negativos, incluindo os animais com resultados sorológicos positivos ou inconclusivos no ELISA-BLV (Figura 2). A amostra de linfoma de um bubalino pertencente a propriedade A-PA também foi negativa para as duas reações de PCR para o vírus BLV.

Todas as 315 amostras de DNA avaliadas e as amostras de DNA obtidas a partir de amostras de linfoma amplificaram o fragmento de 709 pb do gene constitutivo GAPDH.

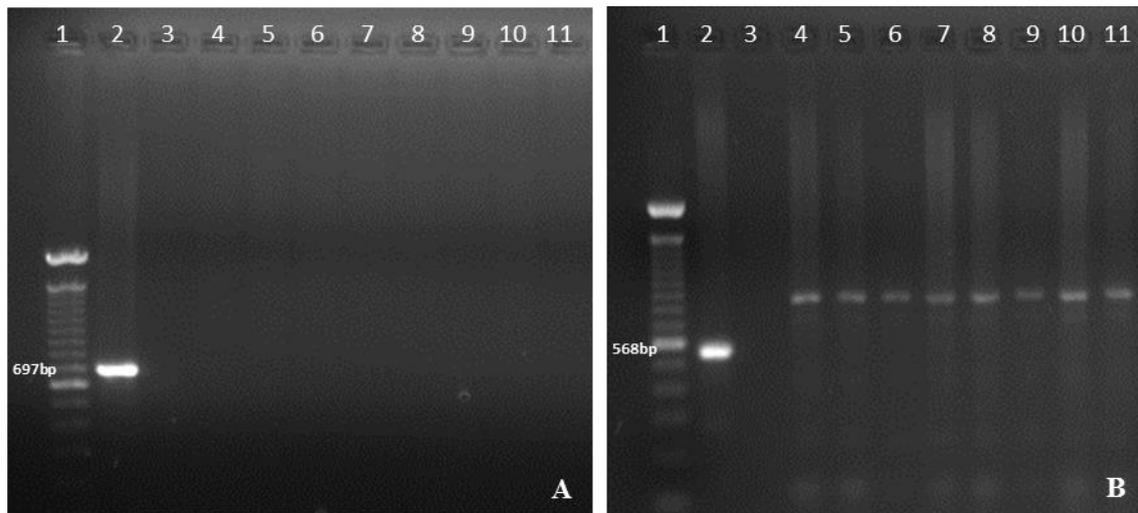


Figura 2. Eletroforese dos produtos da PCR para a região do gene *tax* (PCR-*tax*) (A) e *env* (PCR-gp51) (B) do *Bovine leukemia virus* em amostras de bubalinos. 1: Padrão de peso molecular de 100 pb, 2: controle positivo, 3: controle negativo, 4-11: amostras de búfalos. Todas as amostras de DNA obtido do sangue total e de uma amostra de linfoma, apresentaram resultados negativos em ambas as PCRs.

3.5. Discussão

O ELISA anti-gp51 é um ELISA competitivo, que utiliza um anticorpo monoclonal contra a gp51 que compete com anticorpos do soro do animal testado pela ligação com a proteína gp51 adsorvida na placa e por isso tem alta especificidade. Nenhuma amostra de soro bubalino foi positiva neste ELISA, concordado em 100% com os resultados obtidos na IDGA. Dados semelhantes foram encontrados por outros autores em bubalinos (Romero et al., 1981; Wang, 1991; Meas et al., 2000a; Rajão et al., 2010).

Setenta e sete amostras foram positivas no ELISA anti-BLV, porém a detecção de DNA proviral do BLV não foi confirmada por meio de duas técnicas de PCRs utilizadas, uma para o gene *tax* e outra para o gene *env* (região da gp51) do BLV. Esses resultados indicam que o ELISA-BLV apresentou resultados falso positivos.

No ELISA-BLV apesar do fabricante não informar como o antígeno foi produzido, parece utilizar a partícula viral inteira pouco purificada, o que pode favorecer o aparecimento de reações inespecíficas. O kit é padronizado para bovinos e utiliza um conjugado anti-IgG de ruminantes. Em um experimento em que este conjugado foi testado frente IgGs de ovinos, bovinos, caprinos, bubalinos e equinos, observou-se reação com todas as espécies, inclusive com a IgG de equino que não é um ruminante, mostrando pouca especificidade desse conjugado (dados não mostrados).

Durante as leituras dos exames de IDGA, observou-se a ocorrência de linhas inespecíficas, porém sem identidade com as linhas formadas pelos controles positivos, cuja leitura por um profissional pouco treinado poderia gerar interpretação equivocada.

A amostra de linfoma de um bubalino proveniente de um rebanho com doença semelhante a leucose enzoótica bovina, foi negativa na PCR-*tax* e PCR-gp51 para o BLV. O soro deste animal

foi negativo pelo teste de IDGA e ELISA-gp51. Alguns trabalhos diagnosticaram clinicamente a ocorrência de leucose enzoótica bovina em bubalinos com linfoma, porém nenhum deles detectou a presença do BLV ou anticorpos contra o vírus nos animais enfermos (Vale-Echeto et al., 2009; Chand et al., 2012). Este fato merece ser tratado com atenção, pois baseado nos nossos resultados e em trabalhos anteriores (Bhattacharya, 1967; Singh et al., 1979; Singh et al., 1980), a etiologia do linfoma em bubalinos parece não estar associada a infecção pelo BLV e ainda permanece incerta.

Apenas um trabalho detectou a presença de DNA proviral do BLV em bubalinos (Mingala et al., 2009), porém nenhuma amostra teve a sequência de nucleotídeos realizada para confirmar a infecção. Adicionalmente, nenhuma sequência de nucleotídeos ou aminoácidos do BLV obtida de búfalos foi depositada no banco de dados GenBank até o momento.

Esse estudo fornece novos dados epidemiológicos sobre a possível ocorrência natural do BLV em bubalinos e alerta quanto à ocorrência de resultados falso positivos ao utilizar kits diagnósticos comerciais não padronizados para esta espécie.

3.6. Conclusão

Não foi detectada a presença de BLV em bubalinos da região amazônica e de Minas Gerais, Brasil. Ao utilizar testes de ELISA não padronizados para bubalinos, deve-se levar em consideração a ocorrência de resultados falso positivos. Nesse estudo a ocorrência de linfoma em búfalos parece não estar associada a infecção pelo BLV e a etiologia da doença bem como sua patogenia devem ser investigadas.

3.7. Referências bibliográficas

- Bartlett, P. C.; Norby, B.; Byrem, T. M., et al. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci.*, v.96, n.3, p.1591-1597, 2013.
- Bhattacharya, P. Lymphosarcoma in Indian buffaloes. *Bull Off Int Epizoot.*, v.68, n.1, p.149-150, 1967.
- Chand, N.; Deshmukh, S.; Banga, H. S., et al. Bovine lymphosarcoma in a buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet Pract.*, v.13, n.1, p.114, 2012.
- Chaves, N. P.; Bezerra, D. C.; Santos, L. S. d., et al. Intercorrência entre leucose enzoótica e brucelose em búfalos (*Bubalus bubalis*) em sistema de produção extensivo. *Pesq Vet Bras.*, v.32, p.131-134, 2012.
- Dolz, G.; Moreno, E. Comparison of agar gel immunodiffusion test, enzyme-linked immunosorbent assay and western blotting for the detection of BLV antibodies. *Zentralbl Veterinarmed B.*, v.46, n.8, p.551-558, 1999.
- Ghysdael, J.; Bruck, C.; Kettmann, R., et al. Bovine leukemia virus. *Curr Top Microbiol Immunol.*, v.112, p.1-19, 1984.

- Gutierrez, G.; Alvarez, I.; Fondevila, N., et al. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet Microbiol.*, v.137, n.3-4, p.224-234, 2009.
- Mammerickx, M.; Portetelle, D.; Burny, A. The diagnosis of enzootic bovine leukosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, v.8, n.3-4, p.305-309, 1985.
- Meas, S.; Ohashi, K.; Tum, S., et al. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *J Vet Med Sci.*, v.62, n.7, p.779-781, 2000a.
- Meas, S.; Seto, J.; Sugimoto, C., et al. Infection of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in water buffalo and cattle populations in Pakistan. *J Vet Med Sci.*, v.62, n.3, p.329-331, 2000b.
- Mingala, C. N.; Konnai, S.; Cruz, L. C., et al. Comparative moleculo-immunological analysis of swamp- and riverine-type water buffaloes responses. *Cytokine*, v.46, n.2, p.273-282, 2009.
- Molnar, E.; Molnar, L.; Guedes, V. T., et al. Naturally occurring bovine leukosis virus in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Brazil. *Vet Rec.*, v.146, n.24, p.705-706, 2000.
- Pinheiro de Oliveira, T. F.; Fonseca, A. A., Jr.; Camargos, M. F., et al. Detection of contaminants in cell cultures, sera and trypsin. *Biologicals*, v.41, n.6, p.407-414, 2013.
- Rajão, D. S.; Bastianetto, E.; Reis, J. P. K., et al. Estudo da infecção pelo vírus da leucose bovina em bubalinos (*Bubalus bubalis*) no estado de Minas Gerais. *Rev Bras Med Vet.*, v.32, n.1, p.42-45, 2010.
- Romero, C. H.; Aguiar, A. A.; Zanolchi, H. G., et al. Susceptibility of the water buffalo (*Bubalus bubalis*) to enzootic bovine leukosis virus. *Pesq Vet Bras.*, v.1, p.137-140, 1981.
- Singh, B.; Singh, K. P.; Parihar, N. S., et al. Clinicopathological studies on lymphosarcoma in Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Zentralbl Veterinarmed A.*, v.26, n.6, p.468-481, 1979.
- Singh, B.; Singh, K. P.; Parihar, N. S., et al. Lymphosarcomatous involvement of reproductive and endocrine organs in Indian buffalo. *Zentralbl Veterinarmed A.*, v.27, n.7, p.583-592, 1980.
- Untergasser, A.; Nijveen, H.; Rao, X., et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.*, v. 35, n.Web Server issue, p.W71-74, 2007.
- Vale-Echeto, O. E.; Montiel-Urdaneta, N.; Simoes, D., et al. Linfoma multicêntrico o linfosarcoma multicêntrico en Búfalo de agua (*Bubalus bubalis*): Estudio Anatomopatológico. Reporte de un caso. *Revista Científica*, v.19, p.257-263, 2009.
- Wang, C. T. Bovine leukemia virus infection in Taiwan: epidemiological study. *J Vet Med Sci.*, v.53, n.3, p.395-398, 1991.

4. CAPÍTULO 2: *Bovine herpesvirus 6* em búfalos (*Bubalus bubalis*) da região amazônica, Brasil*

4.1. Resumo

Esse estudo apresenta a primeira descrição do *Bovine herpesvirus 6* (BoHV-6) em bubalinos da região amazônica, Brasil. Análise filogenética mostrou que as amostras brasileiras foram agrupadas com uma sequência do BoHV-6 depositada no banco de dados GenBank. O vírus foi detectado em búfalos provenientes de rebanhos com e sem histórico da ocorrência de linfoma, os animais também foram sorologicamente testados para o *Bovine leukemia virus* (BLV). Todos os búfalos foram negativos para o BLV. Esses resultados mostram que o BoHV-6 está presente em búfalos no Brasil mas a importância da infecção e sua associação com enfermidades ainda é indefinida.

4.2. Introdução

O *Bovine herpesvirus 6* (BoHV-6), também conhecido como *Bovine lymphotropic herpesvirus* (BLHV) é um herpesvírus da subfamília *Gammaherpesvirinae*, gênero *Macavirus*. O vírus foi descoberto em 1998 nos Estados Unidos em amostras de linfoma bovino (leucose enzoótica bovina - EBL) associado ao *Bovine leukemia virus* (BLV) e em amostras do sangue periférico de bovinos dos estados de Colorado, New York e New Jersey (Rovnak et al., 1998).

Outros autores detectaram o vírus em tecidos parafinados de casos de febre catarral maligna em três bisões e um bovino, também nos Estados Unidos (Collins et al., 2000). O BoHV-6 também foi detectado no exsudato vaginal de vacas com metrite crônica não responsiva a tratamento convencional com antibióticos no Reino Unido (Cobb et al., 2006; Banks et al., 2008) e na Bélgica (Garigliany et al., 2013). Adicionalmente, o vírus foi detectado em um feto bovino abortado no Canadá (Gagnon et al., 2010). Recentemente, o BoHV-6 foi encontrado no sangue periférico de bovinos aparentemente saudáveis na Polônia (Kubiś et al., 2013). A relação do BoHV-6 com doença linfoproliferativa e sua associação com a patogênese de outras enfermidades em bovinos ainda permanecem não definidas.

No estado do Pará, Brasil, nosso grupo de pesquisa tem acompanhado um rebanho de búfalos onde tem sido observada a ocorrência de uma doença linfoproliferativa caracterizada pelo desenvolvimento de linfoma e linfocitose nos animais, cuja etiologia é desconhecida (dados não publicados). Linfoma em búfalos foi relatada por outros autores na Índia (Bhattacharya, 1967; Singh et al., 1979). Nesse estudo investigamos a presença do *Bovine herpesvirus 6* em búfalos de dois estados brasileiros, bem como do *Bovine leukemia virus*, principal agente causador de doença linfoproliferativa nos bovinos. Amostras de sangue total de bovinos também foram avaliadas para o BoHV-6.

*Artigo intitulado *Bovine herpesvirus 6* in buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the Amazon Region, Brazil, publicado na revista *Tropical Animal Health and Production*, v.47, n.2, p.465-468, 2015. DOI: 10.1007/s11250-014-0733-z. Anexo II.

4.3. Material e Métodos

Todos os procedimentos envolvendo a manipulação de animais foram realizados de acordo com os princípios de experimentação animal adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA/UFMG) sob o protocolo 133/2012.

Um total de 314 amostras de sangue total de bubalinos e 21 de bovinos foram avaliadas nesse estudo. Das amostras de bubalinos 293 foram coletadas em sete propriedades do estado do Pará. Búfalos apresentando doença linfoproliferativa foram observados em uma das propriedades (propriedade A-PA) (Tabela 1). As outras 21 amostras foram coletadas de bubalinos de um rebanho no estado de Minas Gerais, onde a doença não tem sido observada. Das 21 amostras de bovinos, cinco eram de uma propriedade no estado do Pará e 17 eram do estado de Minas Gerais. Os bovinos eram criados em propriedades de criação do tipo mista, onde os animais são explorados para leite e para corte e em ambas há o histórico da ocorrência de EBL. Essas propriedades também praticavam a criação de bubalinos.

Amostras de DNA foram extraídas do sangue total dos bubalinos e bovinos por meio do kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Alemanha). Duas PCRs foram realizadas para amplificar as regiões gênicas que codificam a polimerase e a glicoproteína B (gB) do BoHV-6.

O gene *pol* foi testado por meio de seminested PCR (BoHV6-pol-PCR), desenvolvida para amplificar um fragmento de 551 pb na reação externa (BoHV6-F 5'ACAGACGGGCAGCAGATAAG3' e BoHV6-R 5'ATGGTTCGCCCCTGTAGAGT3') e 166 pb na reação interna (BoHV6-F e Snested-R 5'AGTCTACCACGAGCACAGGA3').

Uma PCR convencional (BoHV6-gB-PCR) foi desenvolvida para amplificar um fragmento de 665 pb do gene *gB* do BoHV-6 (BoHV6-gB-F 5'AGGCGACGCTATCTCAGTGT3' e R 5'TGATAAGCCCGAAGACCAACA3'). Esta PCR foi realizada somente nas amostras previamente positivas na BoHV6-pol-PCR. Além disso, amostras de soro de todos os bubalinos foram testadas pelo método de Imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para detecção de anticorpos anti-gp51 do BLV por meio de kit comercial (Tecpar, Brasil).

O sequenciamento foi realizado diretamente dos fragmentos purificados do gel de agarose com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) ou após clonagem dos fragmentos em pGEM®-T Easy Vector System II (Promega, USA). Um clone obtido a partir de um bovino do estado do Pará (BOVBR8-2, GenBank: KM438003 e KM438007) foi utilizado como controle positivo nas PCRs.

4.4. Resultados e discussão

O BoHV-6 foi detectado em sete búfalos do estado do Pará por meio da BoHV6-pol-PCR, resultando em uma ocorrência de 2,23% (Tabela 1). Todas as amostras de DNA de bubalinos do estado de Minas Gerais foram negativas para o BoHV-6, adicionalmente, todas as amostras de soro de ambos os estados foram negativas para o BLV pela técnica de IDGA. Na propriedade com histórico de linfoma a ocorrência do BoHV-6 foi de 10% (1/10), superior às demais propriedades, onde a ocorrência variou de 0 a 3,23% (Tabela 1).

Tabela 1. Ocorrência do *Bovine herpesvirus 6* em bubalinos e bovinos dos estados de Minas Gerais e Pará, Brasil, pela técnica de seminested PCR para o gene *pol* (BoHV6-pol-PCR).

Estado	Propriedades	Histórico de linfoma	n	Amostras positivas para BoHV-6 (%)
<i>Búfalo</i>				
Pará	A-PA	Sim	10	1 (10)
Pará	B-PA	Não	13	0 (0)
Pará	C-PA	Não	84	1 (1,19)
Pará	D-PA	Não	61	2 (3,28)
Pará	E-PA	Não	1	0 (0)
Pará	F-PA	Não	29	0 (0)
Pará	G-PA	Não	95	3 (3,16)
Minas Gerais	H-MG	Não	21	0 (0)
Total			314	7 (2,23)
<i>Bovino</i>				
Minas Gerais	H-MG	Não	10	6 (60)
Minas Gerais	I-MG	Não	6	5 (83,33)
Pará	J-PA	Não	5	3 (60)
Total			21	14 (66,66)

Das sete amostras bubalinas positivas para a região da polimerase (BoHV6-pol-PCR), apenas duas foram também positivas para a região da glicoproteína B por meio da BoHV6-gB-PCR (Figura 1), o que pode ter ocorrido devido a menor sensibilidade desta reação comparada à seminested PCR. Seis sequências obtidas para o gene *pol* do BoHV-6 foram depositadas no GenBank sob os números de acesso: KM437997–KM438002. Para o gene *gB* todas as duas sequências obtidas foram depositadas sob os números de acesso KM438005 e KM438006.

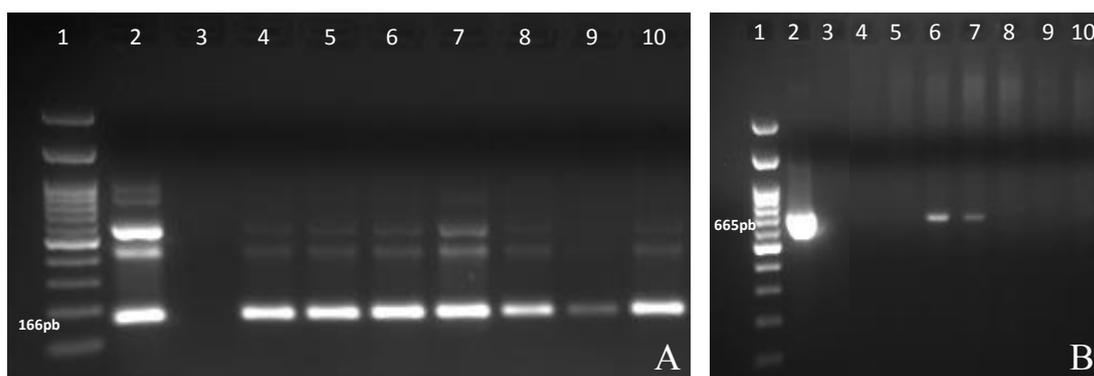


Figura 1. Eletroforese dos produtos da seminested PCR para a região do gene *pol* (BoHV6-pol-PCR) (A) e PCR convencional para o gene *gB* (BoHV6-gB-PCR) (B) do *Bovine herpesvirus 6* em amostras de DNA obtido do sangue total de bubalinos. 1: Padrão de peso molecular de 100 pb (Geneaid Biotech, Taiwan) 2: controle positivo, 3: controle negativo, 4 - 10: amostras de búfalos.

Esta é a primeira detecção do BoHV-6 em búfalos no mundo, embora tenha sido relatada a ocorrência em bovinos (Banks et al., 2008; Kubiś et al., 2013). Entre os bovinos avaliados pela BoHV6-pol-PCR, a ocorrência foi de 66,66% (14/21), sendo que o vírus foi detectado em animais de ambos os estados avaliados (Tabela 1). Uma amostra positiva de um bovino do estado do Pará e um de Minas Gerais foram sequenciadas para análise filogenética. As sequências foram depositadas no GenBank, número de acesso: KM438003 e KM438004 para o gene *pol* e KM438007 e KM438008 para o gene *gB*.

A detecção do BoHV-6 em bovinos na América do Sul fornece novos dados epidemiológicos sobre a ocorrência desse vírus no mundo. A alta ocorrência em bovinos sugere que ele está distribuído de forma ubíqua nos animais (Rovnak et al., 1998). Entretanto, o seu papel como agente patogênico em doenças linfoproliferativas necessita de outros estudos.

As sequências do BoHV-6 obtidas a partir de amostras de búfalos e bovinos apresentaram 100% de similaridade com a sequência do BoHV-6 depositada no GenBank (acesso AF327830.1) para a região da polimerase. Para a região da glicoproteína B (acesso AF327832.1) as amostras de búfalos e bovinos apresentaram 99% de similaridade. Estes resultados eram esperados devido ao alto grau de conservação dessas regiões no genoma dos herpesvírus.

Árvores filogenéticas baseadas nos genes *pol* (Figura 2a) e *gB* (Figura 2b) foram construídas usando a sequência de aminoácidos pelo método *Maximum likelihood method* com 1000 *bootstrap* (MEGA versão 5.2). As árvores foram enraizadas usando o *Human herpesvirus 4*. Similar às observações de outros autores (Chmielewicz et al., 2001), todas as amostras foram agrupadas com outros vírus do gênero *Macavirus*, incluindo CprHV-2, OvHV-2 e AIHV-1, os dois últimos causadores da febre catarral maligna, uma doença linfoproliferativa que afeta bovinos e ruminantes selvagens, respectivamente.

Em humanos, algumas doenças linfoproliferativas estão associadas com gammaherpesvírus do gênero *Lymphocryptovirus*, como o *Human herpesvirus 4* (HHV-4) ou *Epstein Barr virus* (EBV). O EBV está associado com linfomas em humanos, incluindo os linfomas de Hodgkin, linfoma de Burkitt e linfoma difuso de grandes células B, mas o mecanismo patogênico ainda não é completamente esclarecido. Durante a fase de latência, o EBV expressa proteínas e RNAs não codificantes que afetam o ciclo celular, promovendo proliferação e inibindo a apoptose. Em indivíduos saudáveis, o sistema imune limita a proliferação, mas falhas no controle do sistema imune podem resultar em malignidade (Cesarman, 2014).

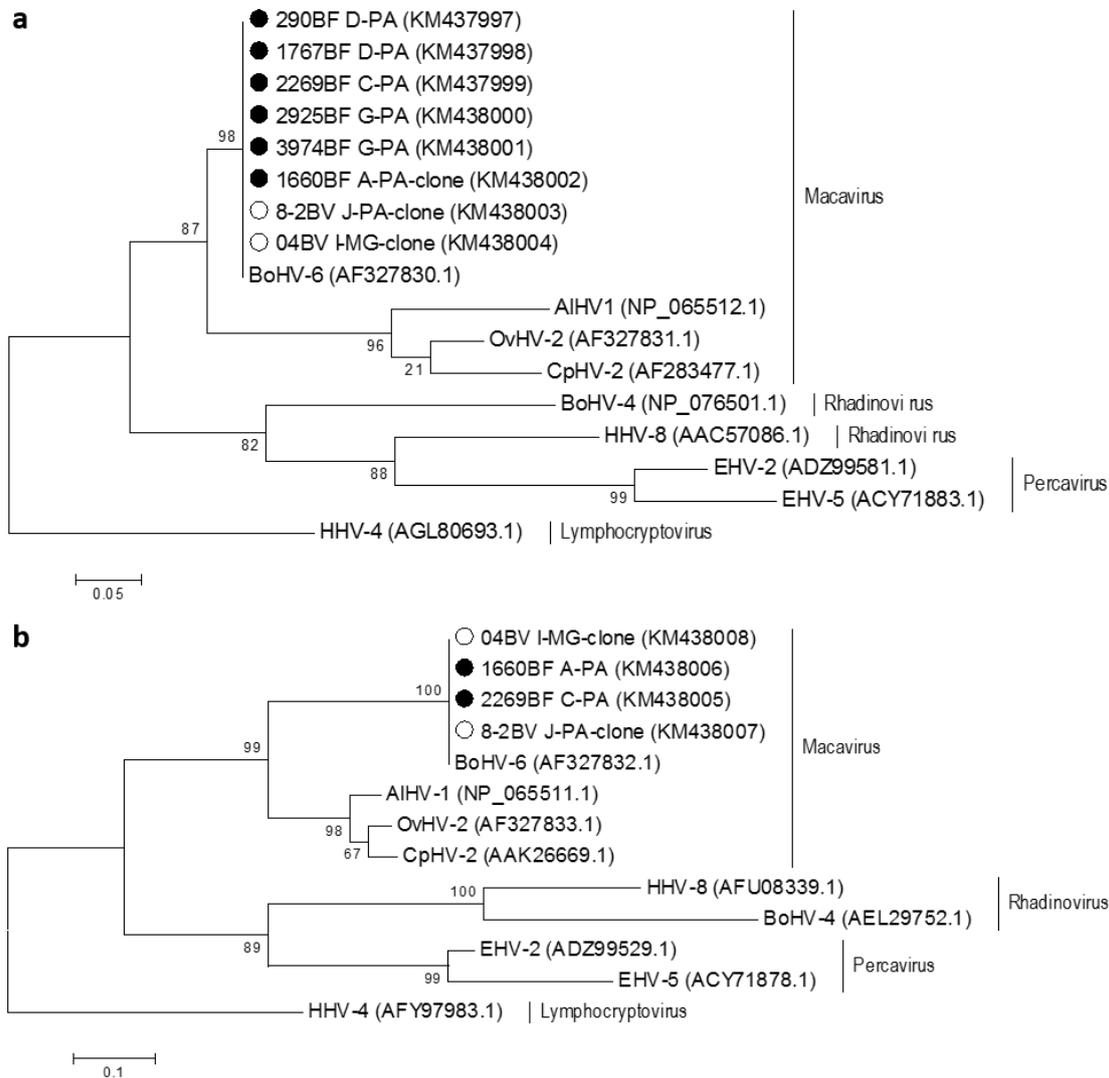


Figura 2. Árvores filogenéticas baseadas na sequência de aminoácidos do BoHV-6, gene *pol* (a) e gene *gB* (b) mostra que todas as amostras brasileiras do BoHV-6 obtidas de búfalos (ponto preto) e bovinos (ponto branco) foram agrupadas no gênero *Macavirus*, subfamília *Gammaherpesvirinae*. HHV-4, *Human herpesvirus 4*; AIHV-1, *Alcelaphine herpesvirus 1*; BoHV-6, *Bovine herpesvirus 6*; CpHV-2, *Caprine herpesvirus 2*; OvHV-2, *Ovine herpesvirus 2*; EHV-2, *Equid herpesvirus 2*; EHV-5, *Equid herpesvirus 5*; BoHV-4, *Bovine herpesvirus 4*; HHV-8, *Human herpesvirus 8*. As árvores foram construídas usando *Maximum likelihood method*, 1000 *bootstrap* no programa MEGA 5.2. As árvores foram enraizadas usando o vírus HHV-4 como grupo externo.

O BoHV-6 não está associado com uma enfermidade em bovinos devido à alta ocorrência em animais aparentemente saudáveis. Em bubalinos a ocorrência foi baixa e sua associação com desordens linfoproliferativas deve ser investigada, uma vez que os membros da subfamília *Gammaherpesvirinae* são caracterizados pela sua especificidade predominante por células linfoblásticas, onde se replicam e estabelecem latência. Além disso, estes vírus podem ser

especificamente adaptados para linfócitos B ou T e são conhecidos por possuírem potencial oncogênico (Engels e Ackermann, 1996).

Lesões macroscópicas compatíveis com linfoma têm sido observadas em búfalos durante necropsias no estado do Pará, indicando que a doença pode existir nos animais de forma silenciosa. Embora o BLV tem sido associado a ocorrência de linfoma em búfalos por alguns autores (Vale-Echeto et al., 2009; Chand et al., 2012), a infecção pelo BLV nunca foi confirmada pela detecção do vírus ou DNA proviral em animais enfermos. Todas as 314 amostras de búfalos avaliadas nesse estudo foram sorologicamente negativas para o BLV, indicando que a doença provavelmente não está associada a este vírus, como observado por outros autores (Meas et al., 2000a). Desta forma, a etiologia dos linfomas em búfalos permanece sob investigação.

4.5. Referências Bibliográficas

- Banks, M.; Ibata, G.; Murphy, A. M., et al. Bovine lymphotropic herpesvirus and non-responsive post-partum metritis in dairy herds in the UK. *Vet J.*, v.176, n.2, p.248-250, 2008.
- Bhattacharya, P. Lymphosarcoma in Indian buffaloes. *Bull Off Int Epizoot.*, v.68, n.1, p.149-150, 1967.
- Cesarman, E. Gammaherpesviruses and lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Pathol.*, v.9, p.349-372, 2014.
- Chand, N.; Deshmukh, S.; Banga, H. S., et al. Bovine lymphosarcoma in a buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet Pract.*, v.13, n.1, p.114, 2012.
- Chmielewicz, B.; Goltz, M.; Ehlers, B. Detection and multigenic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats. *Virus Res.*, v.75, n.1, p.87-94, 2001.
- Cobb, S. P.; Banks, M.; Russell, C., et al. Bovine lymphotropic herpesvirus in a UK dairy herd. *Vet Rec.*, v.158, n.23, p.807-808, 2006.
- Collins, J. K.; Bruns, C.; Vermedahl, T. L., et al. Malignant catarrhal fever: polymerase chain reaction survey for ovine herpesvirus 2 and other persistent herpesvirus and retrovirus infections of dairy cattle and bison. *J Vet Diagn Invest.*, v.12, n.5, p.406-411, 2000.
- Engels, M.; Ackermann, M. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Vet Microbiol.*, v.53, n.1-2, p.3-15, 1996.
- Gagnon, C. A.; Allam, O.; Drolet, R., et al. Quebec: Detection of bovine lymphotropic herpesvirus DNA in tissues of a bovine aborted fetus. *Can Vet J.*, v.51, n.9, p.1021-1022, 2010.
- Garigliany, M.-M.; Bayrou, C.; Cassart, D., et al. Bovine lymphotropic herpesvirus detected in Belgium. *Vet Rec.*, v.172, n.20, p.535-536, 2013.
- Kubiś, P.; Materniak, M.; Kuźmak, J. Comparison of nested PCR and qPCR for the detection and quantitation of BoHV6 DNA. *J Virol Methods*, v.194, n.1-2, p.94-101, 2013.
- Meas, S.; Ohashi, K.; Tum, S., et al. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *J Vet Med Sci.*, v.62, n.7, p.779-781, 2000.

Rovnak, J.; Quackenbush, S. L.; Reyes, R. A., et al. Detection of a novel bovine lymphotropic herpesvirus. *J Virol.*, v.72, n.5, p.4237-4242, 1998.

Singh, B.; Singh, K. P.; Parihar, N. S., et al. Clinicopathological studies on lymphosarcoma in Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Zentralbl Veterinarmed A.*, v.26, n.6, p.468-481, 1979.

Vale-Echeto, O. E.; Montiel-Urdaneta, N.; Simoes, D., et al. Linfoma multicéntrico o linfosarcoma multicéntrico en Búfalo de agua (*Bubalus bubalis*): Estudio Anatomopatológico. Reporte de un caso. *Revista Científica*, v.19, p.257-263, 2009.

5. CAPÍTULO 3: Linfoma multicêntrico em búfalos da região Amazônica, Brasil

5.1. Resumo

A presença de linfoma em búfalos foi inicialmente relatada na Índia na década de 1960. A doença é semelhante à leucose enzoótica bovina (EBL) causada pelo *Bovine leukemia virus* (BLV) em bovinos, porém, de acordo com os nossos resultados e de outros estudos, a etiologia dos linfomas em búfalos parece não estar associada ao BLV. O objetivo deste trabalho é descrever quatro casos da doença em búfalos de um mesmo rebanho na região amazônica, Brasil e realizar um estudo clínico-anatomopatológico, imunohistoquímico e etiológico dos linfomas. Ao longo de dez anos foram observados quatro búfalos apresentando emagrecimento progressivo, aumento de volume dos linfonodos periféricos e nodulações no tecido subcutâneo. Na necropsia foram observadas massas tumorais de coloração esbranquiçada na forma de nódulos no tecido subcutâneo, nódulos miliares nas superfícies serosas de órgãos abdominais e torácicos, e tumores em linfonodos e outros órgãos. Na histopatologia observou-se a proliferação de linfócitos neoplásicos. Um estudo imunohistoquímico revelou que as neoplasias são formadas pela proliferação predominante de linfócitos B. Não foi detectada a presença de material genético do BLV nos linfomas pela técnica de real time PCR, assim como pela marcação imunohistoquímica utilizando anticorpos monoclonais contra duas proteínas virais. O *Bovine herpesvirus 6* também não foi detectado nos tumores. Por outro lado, o *Bovine immunodeficiency virus* (BIV) foi detectado em amostras de linfoma, linfonodo e rins de um dos animais. A ocorrência de linfoma em búfalos é relatada pela primeira vez no Brasil e é caracterizada por linfoma multicêntrico de células B. A etiologia da enfermidade parece não estar associada ao BLV e a detecção do BIV em amostras de linfoma de um animal enfermo merece estudos futuros considerando o potencial oncogênico desse vírus.

5.2. Introdução

No Brasil o rebanho bubalino é estimado em 1.332.284 cabeças, de forma que 66% desses animais são criados na região norte do país, principalmente no estado do Pará (Brasil, 2013). As principais raças criadas no Brasil são Murrah, Mediterrâneo, Jafarabadi e Carabao, as quais são exploradas para produção de carne, sobretudo de forma extensiva, e para produção de leite em sistema semi-intensivo.

Os bubalinos são comumente criados de forma semelhante aos bovinos pois se aparentam fenotipicamente a esta espécie. Grande parte dos proprietários e veterinários emprega as mesmas ferramentas de manejo usadas na espécie bovina e esquecem das particularidades de cada espécie. De forma semelhante, pesquisadores transferem estudos realizados em bovinos para a espécie bubalina sem antes realizar uma investigação mais detalhada.

Nosso grupo de pesquisa tem observado há 10 anos a ocorrência de uma doença linfoproliferativa em bubalinos na região amazônica, estado do Pará, Brasil. Linfoma é uma neoplasia maligna do sistema imune caracterizada pela proliferação neoplásica de linfócitos, que provoca a formação de massas tumorais em diversos órgãos. Em bubalinos a ocorrência de linfoma vem sendo reportada desde 1967 na Índia (Bhattacharya, 1967).

As lesões são caracterizadas por flóculos (nódulos miliares), nódulos e papilas de crescimento contínuo e aspecto aveludado nas superfícies parietal e visceral de membranas serosas de órgãos. O envolvimento de linfonodos ocorre desde discreta tumefação até diversos graus de aumento de volume (Singh, 1968; Singh et al., 1980).

A etiologia da enfermidade em búfalos ainda não está esclarecida e devido ao caráter multicêntrico dos tumores, alguns autores sugerem o envolvimento de algum agente viral (Singh et al., 1973). Em bovinos o surgimento de linfomas está associado a infecção pelo *Bovine leukemia virus* (BLV) causador da leucose enzoótica bovina (EBL), onde de 1 a 5% dos animais infectados desenvolvem linfoma, de 20 a 30% linfocitose persistente e a maioria permanece assintomática por longos períodos (Ghysdael et al., 1984; Bartlett et al., 2013).

Trabalhos mais recentes descreveram a ocorrência de linfoma em bubalinos na Venezuela (Vale-Echeto et al., 2009) e na Índia (Chand et al., 2012), os autores discutem como sendo casos de EBL, porém nenhum deles comprovou a presença do vírus nos animais enfermos.

O *Bovine immunodeficiency virus* (BIV) foi estudado em 607 amostras de DNA do sangue total de bubalinos do Brasil e observou-se uma ocorrência de 4,4% por biologia molecular (Albernaz, 2014). Em bovinos, o BIV foi associado a ocorrência de linfoma e linfadenomegalia em animais inoculados experimentalmente (Rovid et al., 1996).

Um estudo mais acurado da etiologia dos linfomas nos bubalinos ainda não foi realizado e poucos relatos dessa enfermidade podem ser encontrados na literatura mundial. No Brasil a ocorrência de linfoma em bubalinos nunca foi relatada. O objetivo deste trabalho foi descrever quatro casos de linfoma em búfalos de um rebanho na região amazônica e realizar um estudo clínico-anatomopatológico, imunohistoquímico e etiológico desta enfermidade.

5.3. Material e métodos

Animais

Quatro casos clínicos de linfoma em bubalinos (casos clínicos 01, 02, 03 e 04) pertencentes a uma propriedade na região amazônica (propriedade A-PA) foram estudados. A propriedade era localizada na cidade de Castanhal, estado do Pará, Brasil e realiza a criação de bovinos e bubalinos para reprodução.

Dados epidemiológicos, tais como raça, idade, sexo e sistema de criação foram obtidos através de visita técnica e consulta informal de tratadores e proprietário.

Estudo clínico e anatomopatológico

Os animais foram avaliados clinicamente quanto à presença e localização de nódulos tumorais, aumento de volume dos linfonodos periféricos, apetite e estado corporal.

Os quatro animais foram submetidos a exame anatomopatológico, fragmentos de tecido tumoral foram coletados e fixados em formalina a 10% e enviados ao Setor de Patologia Animal, Projeto Saúde Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde foram processados rotineiramente para a histologia e incluídos em parafina. Os fragmentos foram seccionados a 5 µm, corados com hematoxilina e eosina (HE) e avaliados em microscopia óptica.

No caso clínico 04 também foram coletados fragmentos de rins, linfonodo, glândula salivar, testículo, fígado e baço.

Estudo imunohistoquímico

Foi realizado exame imunohistoquímico no fragmento de tumor e órgãos do animal 04 para caracterizar o tipo de linfócito presente nos linfomas.

Para o estudo imunohistoquímico, secções de 4 µm foram colocadas em lâminas gelatinizadas, os sítios antigênicos foram recuperados com a solução Dako Cytomation Target Retrieval Solution Citrate pH 6,0 (Dako, EUA) antes da incubação overnight com os anticorpos anti-CD79a (clone HM47/A9, DBS, Pleasanton/CA, EUA), diluição 1:500, expresso em linfócitos B e anti-CD3 (clone CD3-12, University of California, Davis/ CA, EUA), diluição 1:200, expresso em linfócitos T. Posteriormente, foi feita a adição de anticorpo comercial secundário Dako Advance HRP Link (Dako, EUA), enzima Dako Advance HRP Enzyme, revelação da reação com DAB (Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System) e contra coloração com Hematoxilina de Mayer's.

Para avaliar a presença de proteínas virais do BLV, foi realizada imunohistoquímica com anticorpos monoclonais contra a glicoproteína gp51 do envelope viral (VMRD, EUA), diluição 1:100 e contra a proteína p24 do capsídeo viral (VMRD, EUA), diluição 1:500. Para controle positivo das reações, células FLK (Fetal lamb kidney) persistentemente infectadas com o BLV foram cultivadas sobre lamínulas durante 48h, fixadas com acetona durante 30 minutos e processadas juntamente com os fragmentos tumorais de forma semelhante ao citado anteriormente.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico para avaliação qualitativa da presença ou ausência de marcação pelos anticorpos específicos.

Estudo etiológico

Três agentes, o BLV, o *Bovine herpesvirus 6* (BoHV-6) e o *Bovine immunodeficiency virus* (BIV), foram pesquisados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em fragmentos de linfoma e órgãos do animal 04.

Os fragmentos de tecido em parafina foram seccionados a 5 µm e submetidos a extração de DNA usando o Kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante para amostras FFEP (formalin-fixed, paraffin-embedded tissues).

Amostras congeladas de fragmentos de tumor do animal 04 também foram submetidas a extração do DNA total com o kit citado acima de acordo com as recomendações do fabricante para amostras de tecido fresco.

As amostras de DNA foram submetidas a seminested PCR para o BIV, gene *pol* – região que codifica a enzima DNA polimerase – amplificando um fragmento de 385 pb na reação externa e 154 pb na reação interna, segundo metodologia previamente padronizada (Rodrigues, 2014). Foi realizada real time PCR (qPCR) para o BLV, gene LTR, amplificando um fragmento de 120 pb de acordo com estudo prévio (Jimba et al., 2012). O BoHV-6 foi pesquisado por meio de seminested PCR para o gene *pol* (De Oliveira et al., 2015).

Uma amostra positiva na seminested PCR para o BIV teve o fragmento amplificado clonado a partir da reação externa em pGEM®-T Easy Vector System II (Promega, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante, transformados e multiplicados em bactéria DH5alfa. Dois clones foram submetidos a miniprep com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega, EUA) para extração dos plasmídeos. A região do inserto (385 pb) no plasmídeo foi submetida ao sequenciamento de nucleotídeos, utilizando os primers da reação externa da seminested PCR, no equipamento ABI 3130, utilizando Big dye e polímero POP7 (Applied Biosystems, EUA).

A sequência obtida (isolado Castanhal04) foi avaliada quanto à qualidade e editada para montagem de contig no site <http://www.biomol.unb.br/phph/>. Foi realizado um Blast da sequência para avaliar o grau de similaridade com a sequência de referência do BIV depositada no GenBank (GenBank database, National Center for Biotechnology Information), acesso M32690.1 (isolado R-29) e os isolados OK (GenBank:U34389.1), FL112 (GenBank:L06524.1) e FL491 (GenBank:L06525.1), os quais foram alinhados pelo método ClustalW no programa Mega5.2.

5.4. Resultados

Dois bubalinos apresentando emagrecimento progressivo, linfadenomegalia que variava de 2 a 20 vezes o tamanho normal dos linfonodos e presença de nodulações com tamanhos variados no tecido subcutâneo foram observados no ano de 2004. O primeiro caso trata-se de uma búfala (01) da raça Murrah e o segundo da raça Mediterrânea (02) (Figura 1A e B).

No ano de 2010 uma búfala da raça Murrah (03) foi observada apresentando como principal sinal clínico aumento de volume da região abdominal e emagrecimento progressivo. Em 2013 foi observado um animal macho da raça Mediterrânea (04) apresentando emagrecimento e grande dificuldade para defecar e urinar (tenesmo e estrangúria), na palpação retal notou-se uma massa tumoral na entrada da cavidade pélvica do lado direito (Figura 1C e D).

Todos os animais possuíam acima de 10 anos de idade e pertenciam a uma mesma propriedade no estado do Pará, Brasil. Não foi possível obter informações sobre o grau de parentesco dos animais, porém são todos oriundos de um único rebanho. O quadro 1 apresenta todos os casos avaliados, informando raça, sexo, idade e localização das lesões do tipo linfoma observadas durante a necropsia.

Após a identificação da doença os animais evoluíram rapidamente para um estado de grande debilidade, com anorexia, caquexia, prostração e evolução das nodulações observadas no tecido subcutâneo e linfonodos periféricos.

Na necropsia dos animais 01 e 02 foram observados nódulos esbranquiçados com tamanho variando de 3 a 10 cm de diâmetro difusamente no tecido subcutâneo (Figura 2A). Estes nódulos apresentavam consistência macia ao corte e superfície multilobulada. Os linfonodos perderam a morfologia normal e a superfície de corte apresentou-se lisa e brilhante com áreas nodulares de coloração esbranquiçada (Figura 2A e B).

No animal 03 observou-se a presença de massas tumorais nas serosas do rúmen, omaso, abomaso, intestinos, fígado, vesícula biliar, peritônio, omento, baço, coração e saco pericárdio. Essas massas apresentavam-se na forma de nódulos miliares de crescimento contínuo com aspecto aveludado ou de couve-flor sobre as superfícies parietais e viscerais dos órgãos (Figura 2D e E).



Figura 1. Linfoma em bubalinos. (A) Animal 01 apresentando nódulos subcutâneos e emagrecimento. (B) Animal 02. (C) Animal 03 com aumento de volume da região abdominal. (D) Animal 04 com tenesmo e estrangúria. Linfadenomegalia: (E) linfonodo cervical superficial (pré-escapular), (F) subilíaco (pré crural) e (G) linfonodo parotídeo.

No animal 04 foi observada a presença de uma grande massa tumoral, medindo 35 x 20 cm localizada na entrada da cavidade pélvica, (Figura 2F e G), que comprimia o reto e a uretra dificultando a defecação e micção do animal, sendo que em uma pequena área, a massa infiltrou-

se na musculatura pélvica. A massa tinha consistência friável e a superfície de corte era multilobulada, de coloração esbranquiçada a bege com aspecto de gordura (Figura 2 G).

Em todos os casos foi observado linfadenomegalia, que se apresentava em linfonodos periféricos ou internos. Massas tumorais foram observadas em diversos órgãos com destaque para o abomaso (Figura 2C), intestinos e coração (Quadro 1).

Quadro 1. Dados epidemiológicos e patológicos de quatro casos clínicos de linfoma em búfalos de uma propriedade (A-PA) localizada no estado do Pará, Brasil.

Casos clínicos	01	02	03	04
Sexo	Fêmea	Fêmea	Fêmea	Macho
Raça	Murrah	Mediterrâneo	Murrah	Mediterrâneo
Idade	Acima de 10 anos	Acima de 10 anos	Acima de 10 anos	Acima de 10 anos
Data da necropsia	07/11/2004	15/12/2004	12/11/2010	08/02/2013
Áreas com presença de neoplasia				
Subcutâneo	+++	+++		
Sistema digestório				
Serosa do rúmen			+++	++
Serosa do omaso			+++	
Mucosa do abomaso	+	+	+	
Serosa do intestino			+++	
Fígado	+	++	+++	
Vesícula biliar			+++	
Peritônio		++	+++	
Omento		+	+++	
Sistema linfático				
Linfonodo parotídeo	+++	++		
Linfonodo submandibular	+++			
Linfonodo pré-escapular	+++			
Linfonodo pré-crural	+++	++		
Linfonodo íleo femoral	+++			++
Linfonodo mediastínico	+	+		
Sistema Cardio-respiratório				
Coração		+++		+++
Saco pericárdio				++
Pulmão		+	+	
Pleura parietal			++	
Baço	+		++	
Outros achados			Presença de grande quantidade de líquido de coloração amarelada na cavidade abdominal e torácica	Massa tumoral localizada na entrada da cavidade pélvica medindo 35 x 20 cm que comprimia o reto e a uretra provocando tenesmo e estrangúria. Espessamento da parede da bexiga.

(+) Pouco acometido, (++) moderadamente acometido e (+++) muito acometido.

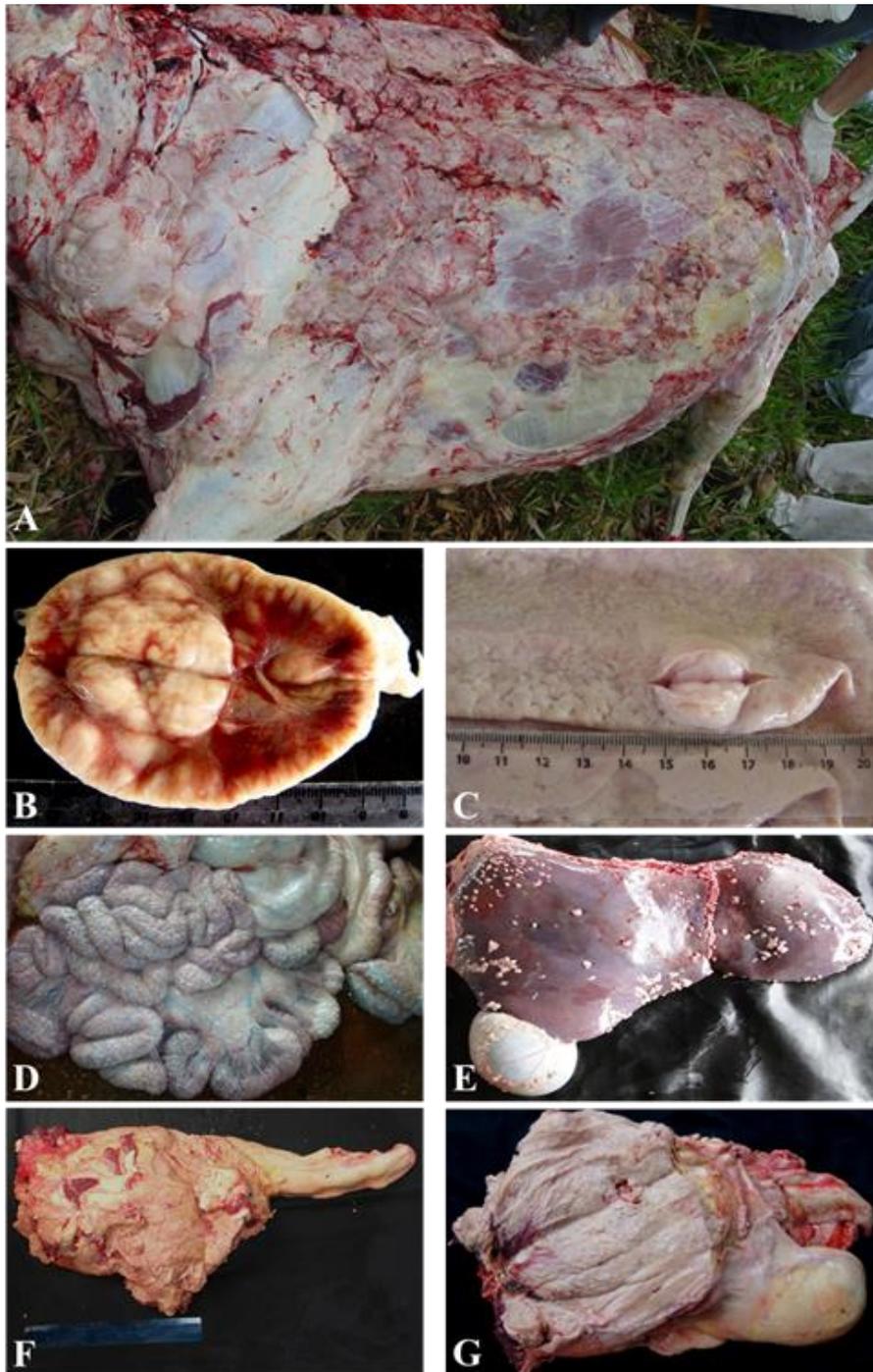


Figura 2. Lesões macroscópicas em bubalinos com linfoma multicêntrico. (A) Tecido subcutâneo com nódulos esbranquiçados de diferentes tamanhos e aumento de volume do linfonodo pré-escapular. (B) Superfície de corte de um linfonodo com presença de massa tumoral. (C) Nódulo tumoral no abomaso. (D) Nódulos miliares na serosa dos intestinos e mesentério. (E) Nódulos miliares na serosa do fígado e vesícula biliar. (F) Massa tumoral medindo 35 x 20 cm localizada na entrada da cavidade pélvica de um bubalino. (G) Superfície de corte da massa tumoral vista em F, caracterizada por coloração esbranquiçada, multilobular e aspecto gorduroso.

A análise histopatológica dos nódulos e linfonodos revelou a presença de massa tumoral, caracterizada pela proliferação de células redondas, discretamente pleomórficas, com citoplasma escasso, núcleos grandes, ovoides, arredondados, basofílicos, por vezes com cromatina frouxa e nucléolos proeminentes, compatíveis com linfócitos. Havia a presença de delicado tecido fibrovascular entremeando o processo neoplásico. Observaram-se áreas eosinofílicas com células em cariólise e cariorrexe, caracterizando necrose de coagulação. A arquitetura normal dos linfonodos estava completa ou parcialmente substituída pelas massas neoplásicas. Também foi observada invasão vascular por células neoplásicas nas massas tumorais (Figura 3A e B).

Áreas esbranquiçadas nos parênquimas do fígado e rins dos animais 01 e 02 correspondiam na microscopia a áreas de infiltração de tecido neoplásico que substituíam a arquitetura normal do órgão.

Na análise imunohistoquímica realizada em cortes do tecido tumoral do animal 04, as células neoplásicas mostraram imunorreatividade com o anticorpo anti-CD79 na membrana plasmática, caracterizando as células como linfócitos B. Poucas células apresentaram expressão de CD3, denotando a escassez de linfócitos T (Figura 3C e D). As células FLK revelaram a expressão citoplasmática da glicoproteína gp51 e da proteína p24 (Figura 3E) do BLV, porém não foi observada marcação de linfócitos neoplásicos em linfonodos e fragmentos de tumor do animal 04 (Figura 3F).

As amostras de DNA extraídas de fragmento de tumor congelado e de tecidos parafinados dos órgãos fígado, rins, glândula salivar, linfonodo, testículos e fragmento tumoral foram negativas para a pesquisa do BLV pela técnica de qPCR e do BoHV-6 por seminested PCR. Por outro lado, as amostras de fragmento tumoral congelado e parafinado de linfonodos e rins foram positivas na seminested PCR para o BIV.

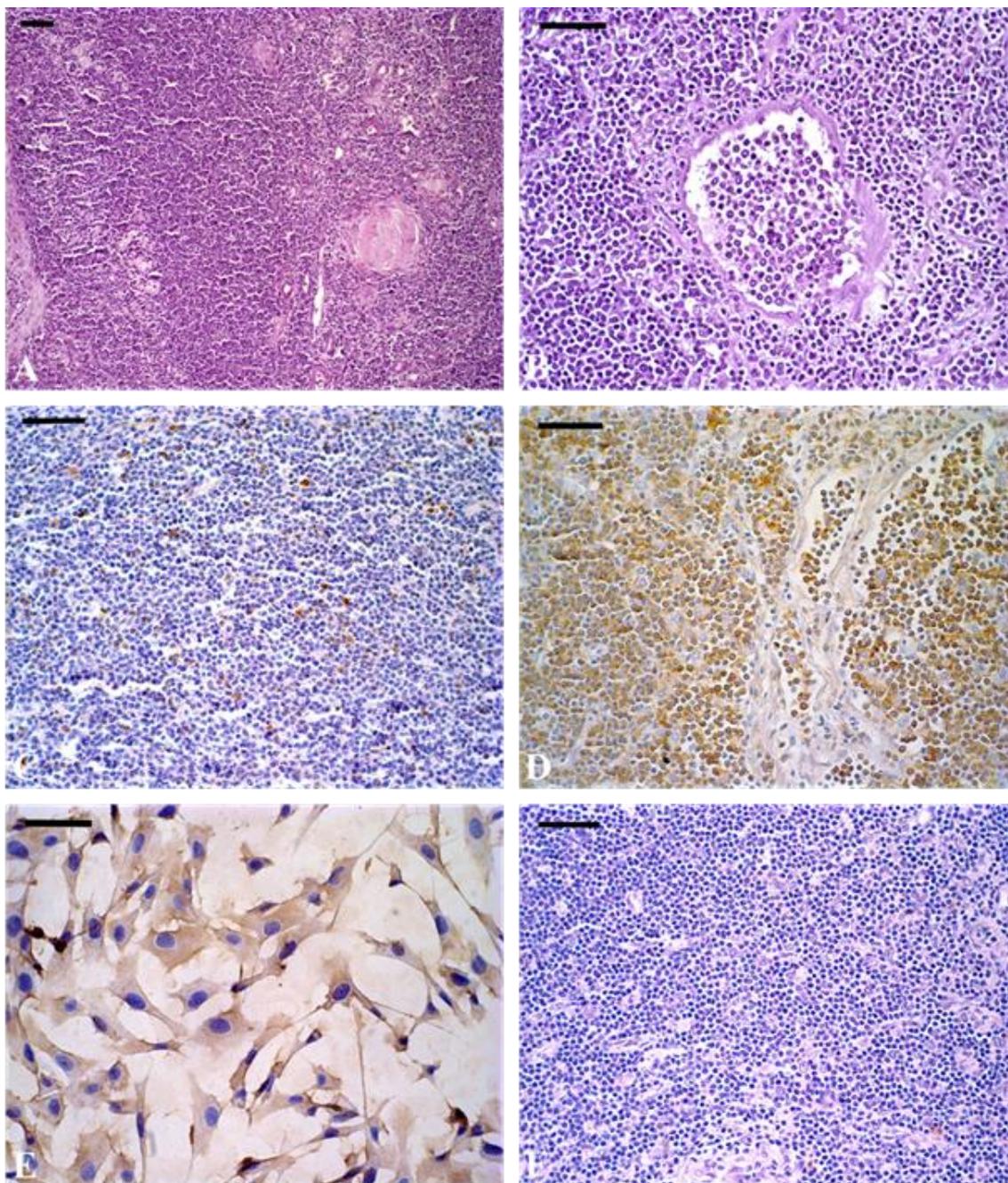


Figura 3. Histologia e imunohistoquímica caso clínico 04. (A) Secção histológica de linfonodo apresentando linfócitos neoplásicos, com perda da arquitetura do órgão. HE. (B) Massa tumoral apresentando área de invasão vascular por células neoplásicas. HE. (C) Marcação de membrana com anticorpo anti-CD3. Reação imunohistoquímica com contracoloração de Hematoxilina de Mayer's. (D) Marcação de membrana com anticorpo anti-CD79. Reação imunohistoquímica com contracoloração de Hematoxilina de Mayer's. (E) Células FLK com marcação citoplasmática com anticorpo anti-p24 do BLV. Reação imunohistoquímica com contracoloração de Hematoxilina de Mayer's. (F) Massa tumoral com ausência de marcação pelo anticorpo anti-p24 do BLV. Reação imunohistoquímica com contracoloração de Hematoxilina de Mayer's. Bars = 50µm.

A sequência de nucleotídeos obtida a partir da amplificação do fragmento de 385 pb do gene *pol* do BIV na amostra de tumor congelada do animal 04 (isolado Castanha04) foi depositada no GenBank sob o número de acesso KP202180. Esta amostra teve 99% de similaridade com o isolado R-29 do BIV em cultivo celular, originalmente obtido de bovino com linfocitose persistente em 1972, 92% com o isolado OK, 92% com o isolado FL112 e 91% com o isolado FL491. O alinhamento de nucleotídeos entre o isolado Castanha04 e o isolado de referência R-29 mostrou apenas uma mutação pontual de transição na posição 380, com a troca de G (guanina) para A (adenina) (Figura 4).

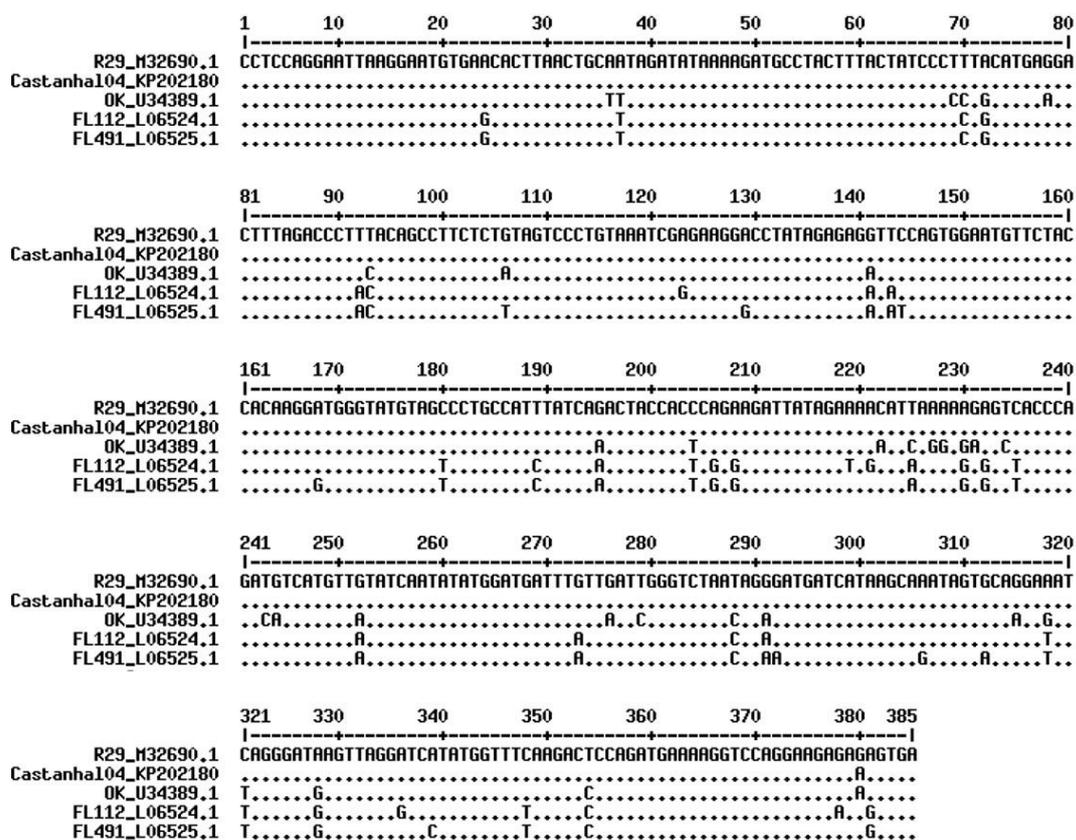


Figura 4. Alinhamento, pelo método ClustalW, da sequência de nucleotídeos de parte do gene *pol* do *Bovine immunodeficiency virus* (BIV). Comparação da sequência isolada da amostra de linfoma de um búfalo do estado do Pará, Brasil, isolado Castanha04 (GenBank: KP202180) com amostra de referência R-29 (GenBank: M32690.1), e os isolados OK (GenBank:U34389.1), FL112 (GenBank:L06524.1) e FL491 (GenBank: L06525.1). Castanha04 e R-29 apresteram 99% de similaridade, com apenas uma mutação pontual de transição na posição 380 do alinhamento. As posições dos nucleotídeos são mostradas de acordo com o isolado R-29, (.) indica identidade de nucleotídeos.

5.5. Discussão

A ocorrência de linfoma em bubalinos foi relatada somente na Índia (Bhattacharya, 1967; Singh, 1968; Singh et al., 1973; Gupta et al., 1977; Singh et al., 1979; Singh et al., 1980) e Venezuela (Vale-Echeto et al., 2009). Este é o primeiro registro da doença em bubalinos no Brasil.

Todos os casos ocorreram em uma única propriedade onde os animais são criados conjuntamente com bovinos em sistema semi-intensivo. O rebanho de búfalos é de aproximadamente 20 animais e ao longo de nove anos quatro casos foram observados, inclusive em animal que foi introduzido neste rebanho há dois anos (animal 04). O que levanta a hipótese de que a doença possa ser transmitida de forma horizontal.

O envolvimento de diversos órgãos e sistemas orgânicos dos animais acometidos comprovam a caráter multicêntrico da enfermidade, fato também demonstrado por outros autores (Singh et al., 1979; Vale-Echeto et al., 2009). No nosso estudo apenas animais mais velhos foram acometidos, sugerindo se tratar de uma enfermidade crônica. Na Índia foi observado que em animais adultos 17,8% apresentaram lesões de linfoma durante o abate, já em animais com até dois anos de idade a frequência foi de 1,23% (Singh, 1968).

As lesões patológicas e histológicas são semelhantes às observadas por outros autores (Singh et al., 1979). Alguns autores encontraram a presença de grande quantidade de linfoblastos e/ou linfócitos (Singh et al., 1973) e várias figuras de mitose na histopatologia dos nódulos tumorais, neste estudo foi observada grande quantidade de linfócitos e poucas células em mitose. A marcação da maioria das células pelo anticorpo anti-CD79, na imunohistoquímica, mostra que os tumores caracterizam-se pela proliferação de linfócitos B, dado ainda não investigado em outros estudos.

Em bovinos com linfoma causado pelo BLV a macroscopia e a histopatologia dos tumores são semelhantes às observadas nos bubalinos nesse estudo. Em bovinos, os tumores podem ocorrer de forma multicêntrica em diversos órgãos do animal, incluindo fígado, linfonodo, baço, globo ocular, abomaso, rúmen, sistema nervoso, entre outros. A histopatologia é caracterizada pela proliferação de células médias a grandes, de origem linfocítica e linfoblástica e com baixo índice mitótico. Essas células possuem fenótipo de linfócitos B e áreas de necrose são observadas nas massas tumorais (Chiba et al., 1995; Malatestinic, 2003).

A etiologia desta enfermidade nos bubalinos ainda é obscura. Suspeitamos do envolvimento de um agente etiológico transmissível, uma vez que o animal 04 apresentou a doença linfoproliferativa dois anos após a sua introdução no rebanho da propriedade A-PA, onde a doença vem sendo observada desde o ano 2004. Devido às características anatomopatológicas dos linfomas nos bubalinos alguns autores têm diagnosticado a doença como EBL (Vale-Echeto et al., 2009; Chand et al., 2012), porém o envolvimento do BLV não está comprovado. Outra observação importante é que todos os animais do nosso estudo apresentavam leucocitose por linfocitose, assim como outros bubalinos aparentemente saudáveis do rebanho (dados não mostrados), muito semelhante ao observado em bovinos infectados pelo BLV (Ghysdael et al., 1984; Bartlett et al., 2013).

Entretanto, amostras de tumor e órgãos de um búfalo com linfoma foram negativas para o BLV por meio de qPCR e imunohistoquímica o que reforça a hipótese de que esse vírus não está envolvido na etiologia do linfoma em bubalino. Em um estudo prévio, avaliamos através de teses

sorológicos e moleculares 315 amostras de búfalos do Brasil e não foi detectada a presença do BLV em nenhum animal (capítulo 1).

Os gammaherpesvírus são conhecidos por possuírem potencial oncogênico (Ackermann, 2006; Cesarman, 2014). Em humanos o *Epstein barr virus* (EBV) está associado com a ocorrência de linfomas de Hodgkin, linfoma de Burkitt e linfoma difuso de grandes células B, entre outros (Thorley-Lawson et al., 2013). O BoHV-6, um gammaherpesvírus inicialmente detectado em amostras de linfomas em bovinos causados pelo BLV (Rovnak et al., 1998), não foi detectado nas amostras de linfoma em búfalos avaliadas no nosso estudo, apesar da sua detecção prévia no sangue periférico de outros bubalinos do mesmo rebanho (De Oliveira et al., 2015).

Por outro lado, amostras de fragmento tumoral, rins e linfonodo foram positivas para o BIV, um retrovírus do gênero *Lentivirus*. Esta é a primeira detecção do BIV em amostras de linfoma em búfalos e a sequência de nucleotídeos do isolado (Castanhal04) teve alta similaridade com a sequência de referência R-29. Durante um estudo sobre a patogênese do BIV, quatro bezerros bovinos negativos para o BLV foram inoculados com a estirpe R-29 do BIV, um dos animais desenvolveu linfadenomegalia e monocitose 160 dias após a inoculação, o bezerro morreu 203 dias após a inoculação diagnosticado com linfoma multicêntrico de células T (Rovnak et al., 1996).

Em felinos, animais infectados pelo lentivírus *Feline immunodeficiency virus* (FIV) têm 5 vezes mais chances de desenvolver linfoma de células B (Beatty, 2014). O vírus atua de forma indireta na indução de tumores (Beatty et al., 1998; Schmiedt et al., 2009), reduzindo os mecanismos de vigilância do sistema imune devido à imunodeficiência e pode estar envolvido na expansão policlonal de células B, que predispõe a mutações levando a oncogênese (Beatty, 2014). Portanto, a importância da detecção do BIV na espécie bubalina deve ser considerada.

Em abatedouros da região amazônica, carcaças de búfalos estão sendo condenadas como casos de tuberculose ou leucose enzoótica bovina devido à presença de neoplasia em diversos órgãos. Dessa forma, a ocorrência de linfoma em búfalos parece ter uma dimensão maior do que realmente imaginamos.

5.6. Conclusão

Búfalos da região amazônica apresentam doença neoplásica caracterizada pela formação de linfoma multicêntrico de células B, porém sua etiopatogenia ainda não está esclarecida. A doença é observada em animais velhos e os principais sinais clínicos são emagrecimento progressivo, linfadenopatia e presença de nodulações no tecido subcutâneo. O BIV foi detectado em amostras de tumor, linfonodo e rins de um animal doente. O papel oncogênico desse vírus deve ser considerado e investigado em estudos futuros.

5.7. Referências bibliográficas

Ackermann, M. Pathogenesis of gammaherpesvirus infections. *Vet Microbiol.*, v.113, n.3-4, p.211-222, 2006.

- Albernaz, T. T. *Detecção molecular do vírus da imunodeficiência viral bovina em búfalos (Bubalus bubalis) no estado do Pará*. 2014. 52f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Universidade Federal do Pará, Belém.
- Bartlett, P. C.; Norby, B.; Byrem, T. M., et al. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci.*, v.96, n.3, p.1591-1597, 2013.
- Beatty, J. Viral causes of feline lymphoma: retroviruses and beyond. *Vet J.*, v.201, n.2, p.174-180, 2014.
- Beatty, J. A.; Lawrence, C. E.; Callanan, J. J., et al. Feline immunodeficiency virus (FIV)-associated lymphoma: a potential role for immune dysfunction in tumorigenesis. *Vet Immunol Immunopathol.*, v.65, n.2-4, p.309-322, 1998.
- Bhattacharya, P. Lymphosarcoma in Indian buffaloes. *Bull Off Int Epizoot.*, v.68, n.1, p.149-150, 1967.
- Brasil. Produção da Pecuária Municipal. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*. v.41, 2013.
- Cesarman, E. Gammaherpesviruses and lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Pathol.*, v.9, p.349-372, 2014.
- Chand, N.; Deshmukh, S.; Banga, H. S., et al. Bovine lymphosarcoma in a buffalo (*Bubalus bubalis*). *Vet Pract.*, v.13, n.1, p.114, 2012.
- Chiba, T.; Hiraga, M.; Aida, Y., et al. Immunohistologic studies on subpopulations of lymphocytes in cattle with enzootic bovine leukosis. *Vet Pathol.*, v.32, n.5, p.513-520, 1995.
- De Oliveira, C. H.; de Oliveira, F. G.; Gasparini, M. R., et al. Bovine herpesvirus 6 in buffaloes (*Bubalus bulalis*) from the Amazon region, Brazil. *Trop Anim Health Prod.*, v.47, n.2, p.465-468 2015.
- Ghysdael, J.; Bruck, C.; Kettmann, R., et al. Bovine leukemia virus. *Curr Top Microbiol Immunol.*, v.112, p.1-19, 1984.
- Gupta, P. P.; Singh, B.; Gill, B. S. Some uncommon neoplasms of Indian water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Zentralbl Veterinarmed A.*, v.24, n.6, p.511-519, 1977.
- Jimba, M.; Takeshima, S. N.; Murakami, H., et al. BLV-CoCoMo-qPCR: a useful tool for evaluating bovine leukemia virus infection status. *BMC Vet Res.*, v.8, p.167, 2012.
- Malatestinic, A. Bilateral exophthalmos in a Holstein cow with lymphosarcoma. *Can Vet J.*, v.44, n.8, p.664-666, 2003.
- Rodrigues, A. S. *Detecção molecular do vírus da imunodeficiência bovina (BIV) em bovinos do estado de Minas Gerais*. 2014. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Rovid, A. H.; Carpenter, S.; Miller, L. D., et al. An atypical T-cell lymphosarcoma in a calf with bovine immunodeficiency-like virus infection. *Vet Pathol.*, v.33, n.4, p.457-459, 1996.
- Rovnak, J.; Quackenbush, S. L.; Reyes, R. A., et al. Detection of a novel bovine lymphotropic herpesvirus. *J Virol.*, v.72, n.5, p.4237-4242, 1998.

Schmiedt, C. W.; Grimes, J. A.; Holzman, G., et al. Incidence and risk factors for development of malignant neoplasia after feline renal transplantation and cyclosporine-based immunosuppression. *Vet Comp Oncol.*, v.7, n.1, p.45-53, 2009.

Singh, B.; Singh, K. P.; Parihar, N. S., et al. Clinicopathological studies on lymphosarcoma in Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Zentralbl Veterinarmed A.*, v.26, n.6, p.468-481, 1979.

Singh, B.; Singh, K. P.; Parihar, N. S., et al. Lymphosarcomatous involvement of reproductive and endocrine organs in Indian buffalo. *Zentralbl Veterinarmed A*, v.27, n.7, p.583-592, 1980.

Singh, C. M. Lymphosarcoma in Indian buffaloes. *Bibl Haematol.*, v.30, p.237-243, 1968.

Singh, C. M.; Singh, B.; Parihar, N. S. Pulmonary involvement in lymphosarcoma of Indian buffaloes. *Bibl Haematol.*, v.39, p.220-227, 1973.

Thorley-Lawson, D. A.; Hawkins, J. B.; Tracy, S. I., et al. The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol.*, v.3, n.3, p.227-232, 2013.

Vale-Echeto, O. E.; Montiel-Urdaneta, N.; Simoes, D., et al. Linfoma multicéntrico o linfosarcoma multicéntrico en Búfalo de agua (*Bubalus bubalis*): Estudio Anatomopatológico. Reporte de un caso. *Revista Científica*, v.19, p.257-263, 2009.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ocorrência de doença linfoproliferativa em búfalos foi relatada na década de 1960 na Índia, porém pouco se conhece sobre essa doença 50 anos depois. Ela é caracterizada pelo desenvolvimento de linfoma multicêntrico de células B. As neoplasias podem ter localização nodal ou extranodal comprometendo diversos sistemas orgânicos dos animais.

A doença é crônica, sendo observada em animais mais velhos e parece ser uma doença infectocontagiosa devido a ocorrência em animais introduzidos no rebanho afetado. Os sinais clínicos importantes são linfadenomegalia, emagrecimento progressivo e nódulos no tecido subcutâneo.

As lesões macroscópicas e microscópicas são semelhantes a leucose enzoótica bovina, porém o *Bovine leukemia virus* não foi detectado na neoplasia e nem no sangue periférico de outros 315 animais, indicando que esse vírus não é o agente etiológico dos linfomas em búfalos.

O *Bovine herpesvirus 6* foi detectado no sangue periférico de búfalos, a importância desse achado na ocorrência de linfoma em búfalos não está estabelecida, porém deve-se levar em consideração o potencial oncogênico que os gammaherpesvírus possuem. Por outro lado, isso mostra que o vírus tem como hospedeiro natural bovinos e bubalinos.

A presença do *Bovine immunodeficiency virus* nas amostras de tecidos neoplásicos sinaliza sobre a possibilidade desse vírus estar associado com a ocorrência de doença linfoproliferativa em bubalinos. Outros casos clínicos devem ser estudados para validar ou negar esta hipótese.

7. ANEXOS

ANEXO I



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UFMG

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo n.º 133/2012, relativo ao projeto intitulado “*Isolamento, diagnóstico sorológico e molecular do vírus da leucose enzootica bovina ou retrovírus semelhante em bubalinos de Minas e Pará*”, que tem como responsável Rômulo Cerqueira Leite está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 26/09/2012. Este certificado expira-se em 26/09/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol n.º 133/2012, related to the Project entitled “*Isolation, molecular and serological diagnosis of bovine leukemia virus or similar retrovirus in buffalo herds from Minas Gerais and Pará*”, under the supervision of Rômulo Cerqueira Leite, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 09/26/2012. This certificate expires in 09/26/2017.

Belo Horizonte, 28/09/2012.

Jacqueline Isaura Alvarez Leite
Coordenadora da CEUA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha- Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516 – Fax: (31) 3409-4592
www.ufmg.br/bioetica/ceua/ceua@bpmo.ufmg.br

ANEXO II

***Bovine herpesvirus 6* in buffaloes (*Bubalus bulalis*) from the Amazon region, Brazil**

Cairo Henrique Sousa de Oliveira · Fernanda Gonçalves de Oliveira · Marcela Ribeiro Gasparini · Grazielle Cossenzo Florentino Galinari · Graciela Kunrath Lima · Antônio Augusto Fonseca Jr. · José Diomedes Barbosa · Edel Figueiredo Barbosa-Stancioli · Rômulo Cerqueira Leite · Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Received: 22 July 2014 / Accepted: 18 November 2014 / Published online: 27 November 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract This study presents the first description of *Bovine herpesvirus 6* (BoHV-6) that was isolated from buffaloes of Amazon region in Brazil. Phylogenetic analysis showed that the BoHV-6 Brazilian strains clustered with the sequence of BoHV-6 from elsewhere available at the GenBank. It was observed in some buffaloes with lymphoproliferative disease in one herd, thus the animals were also tested for *Bovine leukemia virus* (BLV), which has been associated to lymphoma in bovines. All animals were negative to BLV. These results indicate that BoHV-6 is present in buffaloes in Brazil, but the importance and impact of this infection and its association with any illness is still undefined.

Keywords BoHV-6 · Buffalo · Lymphoma · BLV · Amazon

Introduction

Bovine herpesvirus 6 (BoHV-6), also known as *Bovine lymphotropic herpesvirus* (BLHV), is a herpesvirus and a

member of the Gammaherpesvirinae subfamily and *Macavirus* genus. The virus was first detected in 1998 in the USA from bovine lymphoma samples associated with *Bovine leukemia virus* (BLV) as well as from bovine peripheral blood cells samples obtained from Colorado, New York, and New Jersey (Rovnak et al. 1998).

Other researchers detected the virus in paraffin-embedded tissues collected from malignant catarrhal fever cases in three bison and one bovine, also in the USA (Collins et al. 2000). BoHV-6 was also detected in vaginal exudate from cows with chronic metritis non-responsive to conventional antibiotic treatment in the UK (Cobb et al. 2006; Banks et al. 2008) and Belgium (Garigliany et al. 2013). Additionally, BoHV-6 was detected in an aborted fetus in Canada (Gagnon et al. 2010). Recently, the virus was detected in peripheral blood cells from apparently healthy bovines in Poland (Kubiś et al. 2013). The relationship between BoHV-6 and lymphoproliferative disease, and its association with other diseases in bovines, remains to be defined.

In Pará State, Brazil, our group has monitored a buffalo herd where the occurrence of a lymphoproliferative disease from unknown etiology, characterized by lymphocytosis and lymphoma, has been observed in some animals (unpublished data). Lymphoproliferative disease was also reported in buffaloes in India (Bhattacharya 1967; Singh et al. 1979). In this study, we investigated the presence of BoHV-6 in buffaloes from two Brazilian states as well as the presence of BLV, the main agent associated with lymphoproliferative disease in bovines. In addition, bovine samples were also evaluated for BoHV-6.

Materials and methods

All procedures and animal handling followed the ethical principles in animal experimentation, adopted by the Ethics

C. H. S. de Oliveira · F. G. de Oliveira · G. C. F. Galinari · G. K. Lima · R. C. Leite · J. K. P. dos Reis (✉)
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva,
Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais,
6627 Av. Antônio Carlos, Belo Horizonte,
Minas Gerais 30123-970, Brazil
e-mail: jenner@ufmg.br

M. R. Gasparini · E. F. Barbosa-Stancioli
Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

A. A. Fonseca Jr.
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, LANAGRO/
MG, Brasília, Brazil

J. D. Barbosa
Central de Diagnóstico Veterinário, Universidade Federal do Pará,
Belem, Brazil

Committee in Animal Experimentation of UFMG/CEUA, under Protocol n° 133/2012.

Blood samples from 314 buffaloes and 21 bovines were evaluated in this study. Of the buffalo samples, 293 were collected from seven different locations in Pará State in the Brazilian Amazon region. Animals presenting with lymphoproliferative disease were observed on one of these premises (A-PA, see Table 1). The remaining 21 blood samples were collected from buffaloes from Minas Gerais State (Brazil's southeast region) where the disease has not yet been observed. Five bovine samples were collected from a premise in Pará State and 16 were obtained from Minas Gerais State.

DNA samples from whole blood were obtained using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany). Two PCR reactions followed DNA purification in order to amplify the polymerase and glycoprotein B (gB) coding genes from BoHV-6.

The polymerase gene was tested using semi nested PCR (BoHV6-pol-PCR) to amplify a 551 base pair (bp) fragment from a polymerase gene external region (BoHV6-F 5'ACAG ACGGGCAGCAGATAAG3' and BoHV6-R 5'ATGGTTCG CCCCTGTAGAGT3') and a 166 bp fragment from an internal region (using primers BoHV6-F and Snested-R 5'AGTC TACCACGAGCACAGGA3').

Conventional PCR (BoHV6-gB-PCR) was utilized to amplify a 665 bp fragment from the gB gene (BoHV6-gB-F 5'AGGCGACGCTATCTCAGTGT3' and BoHV6-gB-R 5'TGATAAGCCCCGAAAGACCAACA3'). PCR was performed only on samples positive in BoHV6-pol-PCR. Furthermore, all buffalo serum samples were also tested for BLV by agar gel immunodiffusion (AGID) using a commercial assay (Tecpar, Brazil).

Sequencing was performed directly from amplified fragments purified from agarose gels using the Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) and/or from cloned fragments produced using the pGEM[®]-T Easy Vector System II (Promega, USA).

Results and discussion

BoHV-6 was detected in seven buffaloes from Pará State by BoHV6-pol-PCR with an occurrence of 2.23 % (Table 1). All buffalo samples from Minas Gerais State were negative for BoHV-6 and, additionally, all serum samples from both states were negative for BLV by AGID. In the premise with a history of lymphoproliferative disease, the occurrence of BoHV-6 was 10 % (1 in 10), higher than in the other premises where the occurrence ranged from 0 to 3.23 % (Table 1). Of the seven positive BoHV-6 polymerase PCR samples, two were also positive for gB in BoHV6-gB-PCR. All sequences were deposited in the GenBank under accession numbers: KM437997–KM438002 for polymerase and KM438005 and KM 438006 for gB gene.

This is the first report of BoHV-6 in buffaloes though BoHV-6 has been detected in bovines around the world (Banks et al. 2008; Kubiś et al. 2013). Among the bovines evaluated by BoHV6-pol-PCR, the occurrence of BoHV-6 was 66.66 % (14 in 21) with positive animals found in both states (Table 1). DNA sequencing was performed on one bovine BoHV-6-positive sample from each state for phylogenetic analysis (GenBank accession numbers: KM438003 and KM438004 for polymerase, KM438007 and KM438008 for gB gene).

Table 1 Occurrence of *Bovine herpesvirus 6* detected by BoHV6-pol-PCR in buffaloes and bovines from Minas Gerais and Pará states, Brazil

State	Premises	Lymphoproliferative disease	<i>n</i>	BoHV-6-positive samples (%)
Buffalo				
Pará	A-PA	Yes	10	1 (10)
Pará	B-PA	No	13	0 (0)
Pará	C-PA	No	84	1 (1.19)
Pará	D-PA	No	61	2 (3.28)
Pará	E-PA	No	1	0 (0)
Pará	F-PA	No	29	0 (0)
Pará	G-PA	No	95	3 (3.16)
Minas Gerais	H-MG	No	21	0 (0)
Total			314	7 (2.23)
Bovine				
Minas Gerais	H-MG	No	10	6 (60)
Minas Gerais	I-MG	No	6	5 (83.33)
Pará	J-PA	No	5	3 (60)
Total			21	14 (66.66)

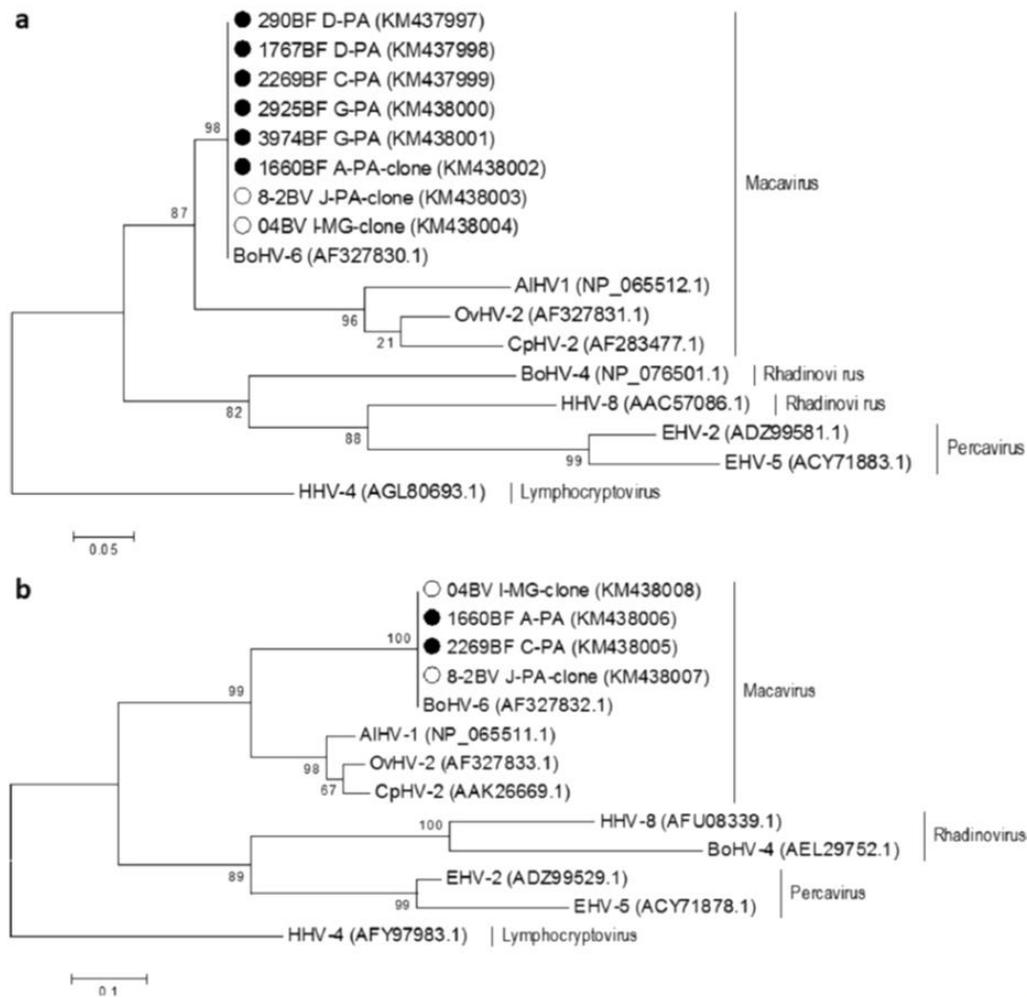


Fig. 1 Phylogenetic trees based on the BoHV-6 amino acid sequences of the **a** polymerase and **b** glycoprotein B genes show all Brazilian BoHV-6 from buffalo (black dot) and bovine (white dot) cluster in *Macavirus* genus, *Gammaherpesvirinae* subfamily, *HHV-4* *Human herpesvirus 4*, *AHV-1* *Alcelaphine herpesvirus 1*, *BLHV* or *BoHV-6* *Bovine herpesvirus 6*, *CpHV-2* *Caprine herpesvirus 2*, *OvHV-2* *Ovine herpesvirus 2*, *EHV-2*

Equid herpesvirus 2, *EHV-5* *Equid herpesvirus 5*, *BoHV-4* *Bovine herpesvirus 4*, and *HHV-8* *Human herpesvirus 8*. The trees were constructed using the maximum likelihood method, the Dayhoff model, and 1000 bootstrap replicates in MEGA 5.2. The phylogenetic tree was rooted using *HHV-4* as the out-group

The detection of BoHV-6 in bovines in South America provides new epidemiological insights into the occurrence of this virus around the world. The high occurrence of BoHV-6 in bovines suggests that the virus is ubiquitously distributed among these animals (Rovnak et al. 1998). However, its role as a pathogenic agent in lymphoproliferative diseases would require further studies once BoHV-6 is widely detected in apparently healthy animals.

BoHV-6 Brazilian sequences showed that samples originating from bovines and buffaloes had 100 % identity with the BoHV-6 polymerase sequence available in the GenBank (access number: AF327830.1). For the gB (accession number AF327832.1) samples originating from buffalo and bovine

had 99 % identity. This finding was expected because the polymerase and gB regions are highly conserved in the herpesvirus genome.

Phylogenetic trees based on the polymerase (Fig. 1a) or gB (Fig. 1b) genes were constructed using amino acid sequences, the maximum likelihood method, 1000 bootstrap replicates, and the Dayhoff model (MEGA version 5.2). The phylogenetic tree was rooted using *Human herpesvirus 4* as the out-group. Similar to the observations of others (Chmielewicz et al. 2001), all samples were clustered with other *Macavirus* genus viruses including *CpHV-2*, *OvHV-2*, and *AIHV-1*. *OvHV-2* and *AIHV-1* are the causing agents of malignant catarrhal fever, a lymphoproliferative disease that affects bovines and wild ruminants.

In humans, some lymphoproliferative disorders are associated with gammaherpesviruses from the *Lymphocryptovirus* genus, for example, the *Human herpesvirus 4* or Epstein–Barr virus (EBV). EBV has been associated with certain types of lymphomas, including Hodgkin's lymphoma, Burkitt's lymphoma, and diffuse B cell lymphoma, but the virus-induced pathogenesis is not completely understood. EBV infects B lymphocytes and establishes latency. During latency, EBV expresses proteins and transcribes noncoding RNAs that affect the cell cycle, promote cellular proliferation, and inhibit apoptosis. In healthy individuals, the immune system limits this proliferation, but a failure in the immune control might result in malignancy (Cesaman 2014). The role of BoHV-6 as an illness causing agent in bovines is currently unknown despite its high occurrence in these animals. In buffaloes, the occurrence of BoHV-6 was low (2.23 %), and its association with lymphoproliferative disorders should be investigated. Gammaherpesvirinae subfamily members are characterized by their predominant specificity to lymphoblastic cells, where they replicate and establish latency. Moreover, these viruses can be specifically adapted to B or T lymphocytes and are characterized by their oncogenic potential (Engels and Ackermann 1996).

Lymphoma lesions have been observed in buffaloes during necropsy in Pará State, indicating that the disease may exist in buffaloes as a silent illness. Though *Bovine leukemia virus* has been associated with lymphoproliferative disease in buffaloes, BLV infection has never been confirmed by detection of the virus or BLV proviral sequences as well in sick animals (Vale-Echeto et al. 2009; Chand et al. 2012). All 314 buffalo samples evaluated in this study were serologically negative for BLV, indicating that the disease is most likely not associated with this virus, as observed in other studies (Meas et al. 2000). Thus, the etiology of lymphoproliferative disease in buffaloes is still under investigation.

Acknowledgments The authors wish to thank Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais for the financial support for English proofreading. The authors also wish to thank all colleagues from the Laboratório de Retrovírus (EV-UFGM) and Clínica de Ruminantes, Universidade Federal do Pará for their technical support. Financial support for this study was provided by INCT-Pecuária, CNPq, CAPES, and FAPEMIG. JKPR, RCL, EFBS, and JDBN received fellowships from CNPq.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Banks, M., Ibata, G., Murphy, A.M., Frossard, J.P., Crawshaw, T.R. and Twomey, D.F. 2008. Bovine lymphotropic herpesvirus and non-responsive post-partum metritis in dairy herds in the UK. *The Veterinary Journal*, 176, 248–250.
- Bhattacharya, P., 1967. Lymphosarcoma in Indian buffaloes. *Bulletin - Office International des Epizooties*, 68, 149–150.
- Cesaman, E., 2014. Gammaherpesviruses and Lymphoproliferative Disorders. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 349–372.
- Chand, N., Deshmukh, S., Banga, H.S. and Dua, K. 2012. Bovine lymphosarcoma in a buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal Veterinary Practitioner*, 13, 114.
- Chmielewicz, B., Goltz, M., and Ehlers, B., 2001. Detection and multi-genic characterization of a novel gammaherpesvirus in goats. *Virus Research*, 75, 87–94.
- Cobb, S.P., Banks, M., Russell, C. and Thorne, M. 2006. Bovine lymphotropic herpesvirus in a UK dairy herd. *Veterinary Record*, 158, 807–808.
- Collins, J.K., Bruns, C., Vermedahl, T.L., Schiebel, A.L., Jessen, M.T., Schultheiss, P.C., Anderson, G.M., Dinsmore, R.P., Callan, R.J. and DeMartini, J.C. 2000. Malignant catarrhal fever: polymerase chain reaction survey for ovine herpesvirus 2 and other persistent herpesvirus and retrovirus infections of dairy cattle and bison. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, 406–411.
- Engels, M., and Ackermann, M., 1996. Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary Microbiology*, 53, 3–15.
- Gagnon, C.A., Allam, O., Drolet, R. and Tremblay D. 2010. Quebec: Detection of bovine lymphotropic herpesvirus DNA in tissues of a bovine aborted fetus. *The Canadian Veterinary Journal*, 51, 1021–1022.
- Garigliany, M.M., Bayrou, C., Cassart, D., Jolly, S. and Desmecht, D. 2013. Bovine lymphotropic herpesvirus detected in Belgium. *Veterinary Record*, 172, 535–536.
- Kubiś, P., Materniak, M., and Kuźmak, J., 2013. Comparison of nested PCR and qPCR for the detection and quantitation of BoHV6 DNA. *Journal of Virological Methods*, 194, 94–101.
- Meas, S., Ohashi, K., Tum, S., Chhin, M., Te, K., Miura, K., Sugimoto, C. and Onuma M. 2000. Seroprevalence of bovine immunodeficiency virus and bovine leukemia virus in draught animals in Cambodia. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62, 779–781.
- Rovnak, J., Quackenbush, S.L., Reyes, R.A., Baines, J.D., Parrish, C.R. and Casey, J.W. 1998. Detection of a novel bovine lymphotropic herpesvirus. *Journal of Virology*, 72, 4237–4242.
- Singh, B., Singh, K.P., Parihar, N.S., Bansal, M.P. and Singh, C.M. 1979. Clinicopathological studies on lymphosarcoma in Indian buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Zentralblatt für Veterinärmedizin*, 26, 468–481.
- Vale-Echeto, O.E., Montiel-Urdaneta, N., Simoes, D., Vale-Oviedo, O.R., Parra-Maldonado, O., Oviedo de Vale, M.G. and Garcia, A. 2009. Linfoma multicêntrico o linfossarcoma multicêntrico en Búfalo de agua (*Bubalus bubalis*): Estudio Anatomopatológico. Reporte de un caso. *Revista Científica*, 19, 257–263.