

CALIANDRA BONA NASCIMENTO

**LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA EM CURRALEIRO PÉ-DURO:
OCORRÊNCIA E SEQUENCIAMENTO DO GENE *ENV***

TERESINA

2015

CALIANDRA BONA NASCIMENTO

**LEUCOSE ENZOÓTICA BOVINA EM CURRALEIRO PÉ-DURO:
OCORRÊNCIA E SEQUENCIAMENTO DO GENE ENV**

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, visando a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo de Souza Batista (DMV/CCA/UFPI)

TERESINA

2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

N244I Nascimento, Caliandra Bona

Leucose enzoótica bovina em curraleiro pé-duro: ocorrência e sequenciamento do gene ENV / Caliandra Bona Nascimento - 2015.

90 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) –Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

Orientação: Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo de Souza Batista

1. Raça brasileira 2. Enfermidade infectcontagiosa 3. Filogenia
4. Adaptação I . Título


CDD 636.208

**LEUCOSE ENZOOTICA BOVINA EM CURRALEIRO PÉ DURO:
OCORRÊNCIA E SEQUENCIAMENTO DO GENE *ENV***

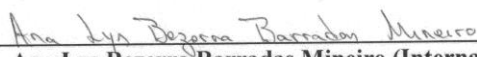
CALIANDRA BONA NASCIMENTO

Tese aprovada em: 04/09/2015

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Maria do Carmo de Souza Batista (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Ana Lys Bezerra Barradas Mineiro (Interna) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Taciana Galba da Silva Tenório (Interna) / DCCV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Geraldo Magela Cortes Carvalho (Externo) / EMBRAPA



Profa. Dra. Tânia Maria Leal (Externa) / EMBRAPA/CPAMN

Dedico,

Aos meus pais, Hoston (in memoriam) e Socorro por tudo que fizeram e fazem por mim até hoje;

As minhas irmãs, pelo apoio em todos os momentos;

Ao João, pelo incentivo e compreensão;

AGRADECIMENTOS

Na vida é fundamental poder contar com o apoio e a ajuda de pessoas, e para a realização deste trabalho, pude contar com várias, direta e indiretamente;

Agradeço à Deus e meus pais pela vida, às minhas irmãs pelo carinho fraterno, ao João pelo amor e apoio.

À minha orientadora Dra. Maria do Carmo de Souza Batista pela orientação, que sempre creditou em mim confiança, repassando seus conhecimentos com carinho e paciência.

Ao Dr. Paulo Sérgio Mattos pela oportunidade e paciência, importantes para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos companheiros da Embrapa Recursos Genéticos, Gleison, Lillian, Luciana, Malane, Naiara e Renato pela amizade e cumplicidade contribuição, disponibilidade, amizade e força que me proporcionaram neste trabalho construídas durante o pouco tempo de convivência.

Ao Dr. Geraldo Magela, Dra. Taciana Galba, Dra. Tânia Leal e Dra. Ana Lys pela participação na banca examinadora e pela contribuição na correção do trabalho.

A todos os docentes que ministraram aulas e compartilharam seus conhecimentos e experiências durante o curso de Doutorado.

Aos meus bons colegas e amigos do Programa de Ciência Animal, Francisco de Assis, Paulo Alex, Raissa Carvalho e Ricardo Abílio pela amizade, apoio nos momentos difíceis obrigada, pelo companheirismo, apoio e palavras incentivadoras.

Aos amigos da Criar Centro Veterinário, André Braga, Angelo Sousa, Eline Andrade, Francisca Barros, Gislyana Medeiros Azevedo, Marina Rebeca, Rubsauberes de Carvalho Leite, e Vidélina Rodrigues por estarem sempre torcendo por esse momento.

Aos funcionários da Pós-Graduação em Ciência Animal, Luiz Gomes da Silva, Vicente de Sousa Paulo, pela solicitude e disponibilidade, sempre.

A Universidade Federal do Piauí pelo título de Doutora em Ciência Animal.

A Embrapa Recursos Genéticos e Meio- Norte, pela disponibilidade dos laboratórios e desenvolvimento dos trabalhos.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Formatação do Trabalho	14
2 OBJETIVOS	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Raças Nativas : História, Atualidade e Perspectivas	16
3.1.1 A raça CPD	24
3.1.1.1 Características Gerais	24
3.1.1.2 Relevância Cultural	28
3.1.1.3 Particularidades Imunológicas	30
3.2 Leucose Enzoótica Bovina (LEB)	31
3.2.1 Etiologia do vírus da LEB	31
3.2.2 Epidemiologia do vírus da LEB.....	34
3.2.3 Transmissibilidade.....	36
3.2.4 Patologia e Sintomatologia.....	39
3.2.5 Diagnóstico	41
3.2.6 Controle e Erradicação	44
4 CAPÍTULO I: Leucose enzoótica bovina em Curraleiros Pé-Duro	46
5 CAPÍTULO II: Sequenciamento parcial do gene <i>env</i> do vírus da leucose enzoótica bovina em Curraleiros Pé-Duro	62
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
7 REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1– Pintura rupestre nas paredes de grutas em Lascaux, França. Fonte: Forbes (1986).	16
FIGURA 2– Curraleiro Pé Duro.	26
FIGURA 3 - Esquema representando a partícula viral do Virus da Leucose Bovina. Fonte: Adaptado de Burny et al (1988).	32

CAPÍTULO I

FIGURA 1 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para os produtos de PCR para o diagnóstico de LEB das amostras. Canaleta 1 - padrão Leader. Canaletas 2 a 9- amostras. Canaletas 10 a 12- Controle positivo, controle negativo e branco.....	51
--	----

CAPÍTULO II

FIGURA 1 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para os produtos de PCR para o diagnóstico de LEB das amostras. Canaleta 1 - padrão Leader. Canaletas 2 a 9- amostras. Canaletas 10 a 12- Controle positivo, controle negativo e branco	67
FIGURA 2 – Resultado do Mega das amostras sequenciadas (nBlast, Genbank)	67
FIGURA 3 – Árvore filogenética desenvolvida através do método de neighbor-joining com o modelo de substituição maximum composite likelihood (Software Mega v. 6). As amostras apresentam o número de acesso/país do estudo. Os números próximos a cada nó representam os valores de 100 repetições de bootstrap, a escala representa o número de substituições/sítio	67

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

TABELA 1– Núcleos de conservação <i>in situ</i> , instituições que os mantêm e respectiva localização. Fonte: Mariante et al., 2011.	23
---	----

CAPÍTULO I

TABELA 1 - Resultados obtidos em amostras de soros pela técnica de PCR. ...	51
TABELA 2 - Resultados do diagnóstico para LEB em amostras de sangue de CPD de acordo com o sexo.	52
TABELA 3 - Resultados do diagnóstico para LEB em amostras de sangue de CPD de acordo com a idade.	54
TABELA 4 - Quantidade de animais com leucocitose em amostras de sangue de CPD de acordo com a idade.	56

CAPÍTULO II

TABELA 1 - Identidade das sequências de nucleotídeos do gene env de isolados brasileiros com a referência brasileira (BlastN, Genbank).	67
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
χ^2	Qui-quadrado
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
Mg	Miligramas
Ag	Antígeno
AKC	Associação Kalunga de Cavalcante
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CPD	Curraleiro Pé-Duro
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
<i>Env</i>	Envelope
FAO	Organização de Alimento e Agricultura das Nações Unidas
FLK-BLV.	Fetal Lamb Kidney Bovine Leucose Virus
FLK	Fetal Lamb Kidney
IDGA	Imunodifusão em Gel de Àgar
IG	Indicação Geográfica
Gp	Glicoproteína
<i>Gag</i>	Sigla em ingles para antígeno específico de grupo
LEB	Leucose enzoótica bovina
LP	Linfocitose persistente
HIV	Sigla em inglês para vírus da imunodeficiência humana
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
<i>Nef</i>	Genes auxiliares
<i>Onc</i>	Oncogene
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PBS	Solução de tampão de fosfato
PCR	Reação em cadeia de Polimerase
Pol	Polimerase
UFPI	Universidade Federal do Piauí
RIFI	Reação de Imunofluorescência indireta
NRA	Ácido Ribonucleico
<i>Ver</i>	Gene de regulação viral
VLEB	Vírus da Leucose Enzoótica Bovina
<i>Sac</i>	Sarcoma
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
WB	Western Blot

RESUMO

NASCIMENTO, C. B. **Leucose enzoótica bovina em Curraleiros Pé-Duro: ocorrência e sequenciamento do gene *env***. 2015. 90f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

O gado Curraleiro Pé-Duro (CPD) se apresenta como um taurino tropicalmente adaptado e com uma riqueza genética imensurável como, a resistência natural a ecto e endoparasitas, além de uma provável resiliência a Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB), enfermidade infectocontagiosa, caracterizada pelo desenvolvimento de linfossarcomas, podendo resultar na morte do animal. Esta enfermidade tem como agente um oncovírus da família Retroviridea tendo como todos os vírus alta taxa de mutações, desencadeando o surgimento de diferentes variedades de um mesmo vírus, dificultando o seu diagnóstico e controle. Por tanto levando-se em consideração a importância da conservação genética do gado CPD, sua resistência e resiliência parasitológica, a emergência de inúmeras doenças nos rebanhos bovinos brasileiros e a necessidade de melhor diagnosticá-las, realizou-se este estudo com o objetivo geral de determinar a presença do vírus da LEB (VLEB) em 191 bovinos, e fazer o estudo filogenético de quatro amostras sequenciadas. Para tanto foi utilizada a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) e, para verificar a prevalência entre estratos de idade e sexo nos rebanhos estudados foram utilizados a amplificação e detecção de parte do gene do envelope (*env*) do vírus, com 521pb sendo em seguida realizado o sequenciamento e a análise filogenética com o uso dos programas SeqScape, BlastN e Mega. A taxa total de CPD reagentes para a enfermidade foi de 7,3% (14 animais). Verificou-se um maior índice de positividade em bovinos acima de 12 meses ($p < 0,05$) e as fêmeas (7,3%) obtiveram a mesma prevalência que os machos (7,7%) ($p < 0,05$). Foi observado que, de 14 animais positivos para a LEB, apenas dois (1%) mostraram leucocitose o que pode indicar algum tipo de resiliência. Obteve-se com a PCR uma forte banda do tamanho esperado com 521pb atendendo ao objetivo básico de gerar produtos para o sequenciamento do fragmento do gene *env* do VLEB. Nas comparações de alinhamentos e na análise filogenética entre as quatro sequências obtidas (PD_BLV 10, PD_BLV 41, PD_BLV 82 e PD_BLV 98) com sequências do GenBank foi demonstrado que o vírus infectante no rebanho de bovinos CPD estudados está mais relacionada com linhagens dos países dos EUA e Austrália. Além disso, nas sequências PD_BLV 10 e 41 houveram 11 e 12 substituições de nucleotídeos respectivamente e nas amostras PD_BLV 82 e 98 houveram 8 substituições de nucleotídeos. Com a árvore filogenética formou-se um agrupamento Austrália-Eua; Brasileiro; Argentina-Brasil e um agrupamento Polônia, Brasil e Alemanha Este estudo permitiu analisar as sequências de nucleotídeos do gene *env*, do vírus da leucose enzoótica bovina (VLEB) em bovinos nativos, sendo estes resultados úteis para aprimorar os métodos de diagnóstico e aumentar os efeitos de programas de forma a contribuir com a futura erradicação e distribuição do VLEB nos animais localmente adaptados do Brasil.

Palavras-chave: Raça brasileira, enfermidade infectocontagiosa, filogenia, adaptação.

ABSTRACT

NASCIMENTO, C. B. **Enzootic Bovine Leukosis in Curraleiro Pé-Duro: occurrence and sequencing of *env* gene.** 2015. 90f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Piauí, Teresina, 2015.

The Curraleiro Pé-Duro cattle (CPD) is presented as a tropically adapted taurine and a genetic wealth immeasurable as the natural resistance to ecto and endoparasites, as well as a likely resilience to Enzootic Bovine Leukosis (EBL), infectious disease, characterized the development of lymphosarcomas, may result in death of the animal. This disease has a family agent as oncoviruses Retroviridea all having as high mutation rate of viruses, triggering the onset of different varieties of the same viruses, impairing its diagnosis and control. So taking into account the parasitological resistance CPD cattle, the emergence of many diseases in Brazilian cattle herds and the need to better diagnose them, first objective it is to determine the presence of the virus LEB (VLEB) in 191 CPD cattle by the polymerase chain reaction technique (PCR) and the study of the prevalence of age and sex in the studied herds. With the amplification product and detection of a fragment of the envelope gene (*env*) of virus was performed 521pb sequencing and genetic analysis with the use of SeqScape, BLASTN and Mega programs. In this study we enrolled a total rate of CPD reagents for the disease of 7.3% (14 animals). A higher positivity rate of cattle over 12 months was found ($p < 0.05$) and females (7.3%) had the same prevalence than males (7.7%) ($p < 0.05$). Of the 14 LEB positive animals, only two (1%) had leukocytosis, which may indicate some form of resilience of the disease by CPDs. Was obtained with a strong PCR band of the expected size with 521pb given the primary objective of generating products for sequencing the fragment of the *env* gene VLEB. In alignments of comparisons and phylogenetic analysis of the four sequences obtained (PD_BLV 10, PD_BLV 41, PD_BLV 82 and PD_BLV 98) with sequences from GenBank it was shown that the infective virus in the flock studied CPD cattle are more closely related strains the countries of USA and Australia. Furthermore, the sequences PD_BLV 10 and 41 there were 11 nucleotide substitutions and 12 respectively, in PD_BLV samples 82 and 98 there were 8 nucleotide substitutions. With the phylogenetic tree formed a grouping Australia-USA; Brazilian; Argentina-Brazil and a grouping Poland, Brazil and Germany. This study allowed us to analyze the sequences of nucleotides of the *env* gene of enzootic bovine leukemia virus in native cattle, which are useful results to improve diagnostics and increase the effects of programs for future eradication and distribution VLEB animals locally adapted in Brazil

Keywords: Native breed, infectious disease, phylogeny, adaptation.

1. INTRODUÇÃO

A espécie bovina, possui grande relevância para a produção pecuária desde o período Neolítico, originou-se através de um processo de domesticação do ascendente selvagem Auroque ou Uru (*Bos primigenius*), boi primitivo ou proto-boi, há aproximadamente 10.000 anos atrás (GEIGI, 2008).

Antes da colonização não existiam bovinos na América, atualmente o rebanho bovino brasileiro é constituído aproximadamente por 60 raças, tanto de origem européia (*Bos taurus*), quanto de origem indiana (*Bos indicus*) e seus cruzados, porém, (SERRANO, 2001; RANGEL et al., 2004).

Os primeiros bovinos introduzidos no Brasil foram trazidos pelos colonizadores no início do século XVI, portanto em sua totalidade as raças crioulas brasileiras tiveram como ancestrais os bovinos portugueses (MARIANTE; CAVALCANTE, 2006), originadas a partir do tronco étnico *Bos taurus ibericus*, dada a esta origem européia é presumido pertencer à subespécie *Bos taurus taurus* (ISSA et al., 2006).

Contudo, no final do século XIX a introdução de novas raças mudou drasticamente este cenário de êxtase por raças brasileiras. A pressão de seleção sobre essas populações foi intensificada devido à forte tendência da sua substituição por raças importadas nas espécies de animais de produção, principalmente os bovinos (EGITO, 2007).

Na atualidade, é evidente a presença maciça dos bovinos originários de países de clima temperado nas grandes regiões produtoras no Sul do Brasil, e por raças zebuínas nas regiões Sudeste e Centro-Oeste promovendo mudanças nos padrões de produção da pecuária (BIANCHINI, 2006; EGITO, 2007).

Apesar de ter propiciado o aumento na produtividade, esta substituição, pode ter representado também uma regressão na riqueza genética do país, pois, a eficiência nos métodos de seleção, conduziu a um risco de extinção das raças brasileiras, diminuindo a variabilidade genética e desvanecendo inúmeras informações contidas nos genes, desenvolvida ao longo de séculos de seleção natural, sendo que, certamente, tal seleção secular conferiu neste caso de estudo, ao CPD características singulares de adaptação (MARIANTE; CAVALCANTE, 2000), sendo, portanto necessária a implementação de medidas que promovam a gestão sustentável dos recursos genéticos (TABERLET et al., 2011).

Diante dessa perspectiva, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) iniciou em 1991 um levantamento sobre a situação de extinção das principais espécies de animais domésticos, desde então, estes programas têm buscado impedir a perda da diversidade genética animal. Em 2007, a comunidade internacional adotou o primeiro *Plano de Ação Mundial* para os *Recursos Genéticos Animais* (ROMANI, 2012).

Levando ainda em consideração a importância da conservação genética de animais localmente adaptados, destaca-se a possibilidade do uso dos genes de resistência desses animais, em combater doenças emergentes de grande importância econômica para a pecuária como a Leucose Enzoótica Bovina (EGITO et al., 2002).

A LEB primeiramente descrita em 1871 (TROIANO, 2009) é uma enfermidade global, que tem como agente causal, o vírus da leucose enzoótica bovina (VLEB), vírus oncogênico da família *Retroviridae*, tendo como principal característica a linfoproliferação (CARNEIRO et al., 2003; SILVA, 2008).

Esta patologia possui evolução crônica e infecção persistente. Desencadeia diversos impactos socioeconômicos, estando a notificação anual de sua ocorrência, prevista nas normas zoonosológicas internacionais por comprometer o desempenho produtivo e reprodutivo dos rebanhos; estabelecer sucessivas condenações de carcaças (FELMER et al., 2006); restringir o comércio de animais e aumentar os custos com medicamentos e serviços com fins paliativos (FERNANDES, 2012).

O desenvolvimento e evolução dos linfossarcomas invariavelmente resultam na morte do animal, pelo acometimento de diversos órgãos dos sistemas digestivo, reprodutivo, imunológico, renal e cardíaco afetando mais o abomaso, útero linfonodos, baço, fígado, rins, coração, respectivamente e o olho e medula espinhal pela neoplasia (MATSUOKA; JEANG, 2007).

No Brasil não existem programas específicos para a prevenção e controle da LEB, que consistem na adoção de medidas que incluem: o diagnóstico, isolamento e a eliminação dos animais reagentes (SILVA et al., 2008). Atualmente não há nenhuma vacina efetiva que confira proteção contra o VLB bem como tratamento viável e efetivo (BIRGEL JUNIOR et al., 2006).

1.1 Formatação do Trabalho

Esta tese compõe-se de “Introdução”, “Revisão de Literatura” e “Referências” organizadas de acordo com as normas da Resolução nº 001/2003-CCMCA, de 22/10/2004. Ademais, dois capítulos: o Capítulo I contendo o artigo intitulado “**Leucose enzoótica bovina em Curraleiros Pé-Duro**” que será submetido no periódico Ciência Rural e o Capítulo II contendo o artigo denominado “**Sequenciamento parcial do gene env do vírus da Leucose Enzoótica Bovina**” que será submetido no periódico Pesquisa Veterinária Brasileira. Os dois artigos foram estruturados segundo as normas dos respectivos periódicos.

2 OBJETIVOS

Levando-se em consideração a riqueza alélica do gado CPD e as consideráveis consequências econômicas desencadeadas pela doença infecto-contagiosa, Leucose Enzoótica Bovina nos rebanhos bovinos, foi realizado este experimento na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMPRAPA unidade Recursos Genéticos e Biotecnologia, com o **objetivo geral** de diagnosticar a Leucose Enzoótica Bovina em animais da raça Curraleio Pé Duro, com os seguintes **objetivos específicos**:

- Verificar a eficiência da PCR no diagnóstico de Leucose Enzoótica Bovina;
- Verificar a presença de leucocitose em Curraleiros Pé-Duro reagentes a Leucose Enzoótica Bovina;
- Isolar as cepas brasileiras da Leucose Enzoótica Bovina em bovinos Curraleiros Pé- Duro;
- Determinar o sequenciamento parcial do gene *env* do vírus da Leucose Enzoótica Bovina;
- Formar um filograma das amostras virais isoladas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Raças naturalizadas brasileiras: história, atualidades e perspectivas

As primeiras representações de bovinos feitas pelo homem referem-se ao Auroque, descrito por Julius Cesar “como um animal um pouco menor que um elefante e com aparência, pelagem e forma de um boi” sendo um dos exemplos mais conhecidos e constante nas pinturas rupestres das grutas de Lascaux-França (Figura 1) (FORBES, 1986) existindo igualmente documentos escritos que se referem ao local e data da morte do último exemplar europeu na Polônia em 1627, entretanto, as espécies africanas e asiáticas foram extintas há cerca de 2.000 anos (LOFTUS et al, 1994).



Figura 1. Pintura rupestre nas paredes de grutas em Lascaux, França. **Fonte:** FORBES (1986)

O Auroque era um animal possivelmente agressivo, de grande porte, de cor negra ou castanha escura, pesando até 1.000 kg e medindo de 1,80 a 2,00 e 1,50 a 1,70 metros de altura, para machos e fêmeas, respectivamente. Cabeça grande, pescoço forte, perfil retilíneo, fronte plana e pernas longas. Os chifres apresentavam-se grossos com mais de um metro de comprimento projetando-se lateralmente em linha reta para depois se dirigirem para frente e em seguida para cima (JORGE, 2014).

As evidências paleontológicas indicam que teriam existido diferentes espécies de bóvidos, atualmente extintas, destas, apenas o Auroque sobreviveu

até a Idade Média nos Continentes Europeu, Asiático e Africano, dando origem aos bovinos que hoje habitam estes Continentes (JORGE, 2014).

A partir desse ancestral originaram-se as duas subespécies bovinas principais, o *Bos primigenius primigenius* (*Bos taurus taurus*) e o *Bos primigenius namadicus* (*Bos taurus indicus*) (ROSA et al., 1992).

Na época da colonização, em meados do século XVI, iniciou-se a criação pecuária no Brasil. Com a ausência de animais da espécie bovina no Continente Americano, estes foram trazidos por colonizadores portugueses e espanhóis transportados juntamente com os escravos nas embarcações (RANGEL et al., 2004).

Os animais importados foram empregados como meio facilitador para locomoção e exploração das novas colônias, produzindo carne e leite, ademais, eram trocados por açúcar e outras mercadorias (PRIMO, 1992; BRITTO, 1998) permitindo que os bovinos fossem protagonistas no processo de ocupação da nova colônia, como descrito segundo José Alípio Goulart (1965, p.64):

“agindo silencioso e humildemente inter fronteiras, ía o boi, sem provocar rushs, nem desequilíbrios demográficos, nem migrações e imigrações em massa, criando condições estáveis para o fortalecimento da vida e da segurança coloniais. O gado era uma invasão. Um Átila perseverante, tardo e inevitável, por isso invencível. Não havia pará-lo. O tupinambá da costa, o caeté ribeirinho, o cariri da caatinga recuavam. Os bois, remoendo, sonolentos, progrediam. Conquistavam tudo.”

Esta importação dos taurinos há cinco séculos, resultou no enriquecimento da diversidade genética, e vem apoiando até os dias atuais a notável produção bovina no país (MARIANTE et al., 2009).

Existem controvérsias a respeito das raças trazidas pelos espanhóis, porém acredita-se que os primeiros eram originários da Andaluzia, no sudoeste da Espanha (RODERO et al., 1992 MAZZA et al., 1994; EGITO, 2011) de acordo com as similaridades físicas descrita entre estes animais e algumas raças nativas andaluzas como a Retinta e a Berrenda (PRIMO, 1992).

Em relação às raças portuguesas, que deram origem a maioria dos bovinos brasileiros, destacam-se a Barrosã, a Mirandesa, a Minhota, a Alentejana e a Arouquesa (PRIMO, 1992; EGITO et al., 2002).

Há duas vertentes sobre a introdução destes animais no Brasil, a primeira condiz segundo SANTIAGO (1975) indicando que em 1534, Martim Afonso de Sousa transportou bovinos provenientes da Ilha da Madeira e de Cabo Verde, e a segunda atribui-se a Tomé de Souza, o primeiro Governador Geral do Brasil e responsável por inserir os animais em 1535, provenientes da Ilha de Cabo Verde diretamente na capitania hereditária de São Vicente (VELLOSO, 1996; BRITTO, 1998; JULIANO, 2006).

Ao longo dos primeiros anos de colonização, especialmente na segunda metade do século XVI a pecuária teve o início de seu desenvolvimento na faixa litorânea como atividade econômica subsidiária à cana-de-açúcar, servindo como alimento e força motriz dos engenhos. Com a expansão dos rebanhos houve a competição pelas mesmas terras destinadas ao cultivo da cana, por consequência, em 1701, reforçando uma tendência de interiorização da pecuária, a Coroa proibiu a criação bovina numa faixa de 10 léguas a partir da costa, estimulando a iminente ocupação dos sertões e a entrada pelos vales para estabelecimento de currais a partir da primeira década do século XVII (DANTAS, 2002).

No início do século XVIII, os numerosos currais baianos se estendiam pela margem direita do São Francisco e pelos vales dos rios das Velhas, das Rãs, Verde, Paramirim, Jacuípe, Itapicuru, Real, Vaza-Barris e Sergipe (ANDRADE, 1973) sendo bem descrita por Antonil (1969, p.184):

“E posto que sejam muitos os currais da parte da Bahia, chegam a muito maior número os de Pernambuco, cujo sertão se estende pela costa desde a cidade de Olinda até o Rio São Francisco (...).”

Da capitania de São Vicente partiram grupos de bovinos levados pelos colonizadores para os campos sulinos. De outro modo, os animais que chegaram aos portos da Bahia emigraram para o sertão nordestino, norte de Minas e oeste da Bahia, dessa forma, as raças importadas ibéricas espargiram-se e fixaram-se em zonas distintas, porém ainda permitindo a miscigenação das mesmas deu-se então, início ao povoamento dos campos nativos do Brasil, originando as raças bovinas brasileiras (SERRANO, 2001). Conjuntamente não deve ser desconsiderada a suposição de que ao longo da interiorização ter intercorrido o extravio de alguns animais, formando rebanhos desconhecidos (OLIVEIRA, 2008).

Ainda que, na Bahia, agreste e cerrado também tenham sido afetados por essa expansão pecuária, foi na caatinga que esta atividade se firmou, de maneira isolada e relativamente independente diferentemente das ocupações do agreste com forte e permanente contato com os engenhos (OLIVEIRA, 2008).

Este deslocamento da pecuária consubstanciou a um maior desenvolvimento do interior das colônias, assim como no início da colonização, o bovino estava novamente auxiliando no desbravamento e fixação do homem à terra reforçando a existência de uma dependência do homem do sertão em relação à pecuária onde é bem expressiva na frase de Andrade (1973, p.252) sobre a atividade na época:

“O gado cria o homem aí, em lugar de o homem criar o gado”.

A interiorização da bovinocultura permitiu a geração de uma verdadeira “civilização do couro”, estabelecendo vínculos entre a pecuária e o mercado internacional, especialmente durante o século XVIII, onde a pecuária desenvolvida nas áreas sertanejas atendeu a essas necessidades, portanto, algumas áreas que não se destacavam pela cana de açúcar puderam se desenvolver melhor economicamente (ABREU, 1982; OLIVEIRA, 2008).

Na história do Piauí Colonial, a política econômica foi toda baseada no comércio do gado Curraleiro Pé-Duro, se consolidando no mercado local (OLIVEIRA, 2008). Entretanto esta fase foi passageira e a produção nordestina de couro nordestina foi ultrapassada pela pecuária sulina, mais produtiva, iniciando um declínio econômico que atingiu toda a região (JUNIOR, 2010).

A partir do final do século XIX e início do século XX em decorrência da demanda crescente por alimentos de origem animal, houve a intensificação da produtividade pecuária do Brasil e, para tanto, vários programas de melhoramento foram implementados visando o seu aumento. Portanto, raças exóticas, animais originados em países de clima temperado e zebuínos foram importados (LARA, 1998; PRIMO, 1992, EGITO, 2007). Logo nos primeiros cruzamentos de zebuínos com animais naturalizados foram gerados descendentes com alto vigor híbrido e com desempenho visivelmente superior ao das raças brasileiras da época que apresentavam menor produtividade (EGITO, 2007; OLIVEIRA, 2008; EGITO et al., 2002)

Assim, produtores replicaram estes cruzamentos por diversas vezes, com o objetivo de diluir o germoplasma das raças brasileiras causando quase que o desaparecimento dos bovinos naturalizados (PRIMO, 1992), além da inclusão de outras espécies na lista de animais em risco de extinção (EGITO, 2007) e ainda a inserção de várias doenças inexistentes no Brasil até a época e que acabaram disseminando-se no rebanho brasileiro (DITTRICH, 2004).

Embora exista abundante literatura sobre os benefícios econômicos das raças melhoradas na pecuária comercial, especialmente na intensiva, quase não tem sido estudada a importância das raças brasileiras e o valor das suas características nos sistemas produção de subsistência e agricultura familiar, típicos de países em desenvolvimento, sendo um dos problemas a serem dissolvidos pelos programas de conservação (MARIANTE et al. 2009). A conservação dos bovinos adaptados assim como de outras espécies, é reconhecidamente importante para a diversidade, sendo seus genes e suas combinações de grande valia para infortúnios futuros (BEJA-PEREIRA et al., 2003).

Observando a história dos animais naturalizados no Brasil desde a colonização, estes bovinos passaram por cerca de 500 anos, por uma rigorosa seleção natural. São raças adaptadas, produtos primeiramente oriundos de uma maior influência do ambiente até o século XVIII (OLIVEIRA, 2008).

Assim como os colonizadores, os animais trazidos pelos colonos tiveram que lidar com as novas condições climáticas e de manejo que o país oferecia, por conseguinte, passaram por um longo período de adaptação e seleção natural, o que lhes permitiu sobreviver em ambientes com temperaturas elevadas, novos agentes patogênicos e parasitos, alimentação distinta e frequentemente inadequada ou insuficiente, cujos descendentes tornaram-se adaptados às condições tropicais (SILVA, 2001).

Portanto esses descendentes são adaptados aos trópicos e particularmente aos diversos ecossistemas existentes no Brasil possuindo características importantes de adaptação, resistência a doenças e a parasitos, em detrimento, apresentam níveis de produção mais baixos que os das raças exóticas (MARIANTE; CAVALCANTE, 2000; EGITO, 2007).

Esta seleção atuou por uma grande variedade de ambientes por todo o país, desde as áreas secas do sertão até as áreas alagadiças do Pantanal, envolvendo eventos recorrentes da miscigenação destas raças gerando uma ampla

diversidade de raças ajustadas a diferentes nichos ecológicos com índices excepcionais de variabilidade fenotípica e melhor adequação às condições locais (EGITO et al., 2011).

Algumas espécimes de raças brasileiras habilmente adaptadas incluem as raças: Criolo Lageano que apresenta grande resistência tanto ao inverno frio quanto às altas temperaturas do Planalto Sul Brasileiro; a Pantaneira, possuindo mais de três séculos de adaptação às pastagens nativa das regiões alagáveis no Pantanal além da habilidade para sobreviver em condições de estresse hídrico e o Curraleiro Pé Duro (CPD) que além de apresentar as mesmas capacidades da última raça (BIANCHINI, 2005) possui resistência natural a ecto e endoparasitas (EGITO, 2007) e a enfermidades transmitidas por esses parasitas, como a babesiose (JULIANO et al., 2007), fato que pode estar relacionado a um processo de seleção natural, pela exposição contínua e longínqua aos vetores e agentes por eles transmitidos. Estudos também indicam uma possível capacidade da rusticidade do CPD levar a certa resistência a doenças infectocontagiosas (JULIANO, 2006).

No decurso inicial da formação destas raças, certamente, houve perda da diversidade genética, concentração e fixação de características específicas, mudanças no comportamento e em aspectos físicos e morfológicos dos bovinos europeus, dando origem a diferentes ecótipos, porém com uma dissipação genética muito grande, além de induzir algumas espécies em risco de extinção (MAZZA et al., 1994; MARIANTE; EGITO, 2002; MARIANTE et al., 2008;).

É consenso mundial a dispersão deste tipo de riqueza genética, a meta de preservação dos animais e o aprimoramento das condições dos pequenos produtores rurais, tem sido o foco de programas nacionais e internacionais, não só nos países em desenvolvimento, mas também na comunidade mundial como um todo (EGITO et al., 2002).

Portanto na atualidade, uma conscientização da conservação das raças naturais naturalizadas se faz necessária, assim como de outras espécies em risco ou não de extinção é reconhecidamente importante para a diversidade, sendo seus genes e suas combinações de grande valia para infortúnios futuros (BEJA-PEREIRA et al., 2003; MARIANTE et al., 2009) que abrangem inclusive mudanças nas condições climáticas, sendo fundamental a adaptação das práticas utilizadas pelos pecuaristas (ILRI, 2011). Estas transformações ambientais podem resultar

em uma redistribuição de animais dentro ou entre regiões, mudanças das espécies utilizadas, mudanças no genótipo ou raça (uso de raças que podem manter a produção em condições adversas) e mudanças no ambiente dos animais (proteção ou atenuação dos danos ambientais). A falta de raças tolerantes ao calor já é percebida como um dos principais entraves na produção na África (GAUGHAN, 2008). É possível que os conflitos sobre os recursos naturais agravem esses problemas (PIMENTEL et al., 2011).

Para tanto em 2007, a comunidade internacional formadora da FAO adotou o primeiro Plano de Ação Mundial para os Recursos Genéticos Animais, que compreende algumas estratégias destinadas a combater a erosão da diversidade genética animal e utilizar, de forma sustentável os recursos genéticos animais. Segundo esta instituição, a conservação de espécies adaptadas justifica-se por inúmeros motivos entre os quais destacam-se: a não previsibilidade da demanda por produtos e mudanças da produção animal; merecem ser conservados do mesmo modo que monumentos históricos, pois são identificados como história e as particularidades de uma determinada região; podem apresentar potencial turístico sendo consideradas como curiosidades regionais por fim, as raças brasileiras podem ser competitivas em relação às raças produtivas que são mais exigentes nutricionalmente. Entretanto torna-se oportuno esclarecer que a conservação e uso dos recursos genéticos podem ser utilizados em concomitância com as raças exóticas para o aprimoramento do uso dos animais na pecuária (CARVALHO, 2002; FAO, 2010).

No Brasil, há uma intensa mobilização de políticas nacionais de conservação tanto no âmbito particular como no público, a persistência de alguns criadores bairristas permitiu a não completa extinção de algumas espécies ademais, no setor público a conservação é executada por centros de pesquisa e por universidades (INSA, 2013).

A variabilidade genética das raças brasileiras é mantida por meio de Núcleos de Conservação (*in situ*) e pela conservação de sêmen e embriões congelados (*ex situ*) (EGITO et al., 2002). A conservação *in situ* corresponde ao meio do uso contínuo dos animais pelos criadores nos seus habitats naturais nos quais os mesmos evoluíram, sendo a mais utilizada (ANDRABI; MAXWELL, 2007). Já a conservação *ex situ in vivo* é aquela realizada por meio da manutenção de populações animais manejados em jardins zoológicos, fazendas governamentais

e/ou fora da área na qual evoluíram ou onde são encontradas normalmente e a conservação *ex situ in vitro*, que se baseia na utilização das técnicas criogênicas para armazenamento de germoplasma animal (FAO, 2010).

Contribuindo com estas questões a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária criou vários centros de conservação (Tabela. 1) que fazem parte da Rede de Recursos Genéticos Animais e Biotecnologia.

Tabela 1- Núcleos de conservação *in situ*, instituições que os mantêm e respectiva localização

Espécie/ Raça	Unidade	Local
Bovino Pantaneiro	Embrapa Pantanal	Corumbá, MS
Bovino Curraleiro	Meio Norte	São João do Piauí, PI
Búfalos Carabao e Baio	Embrapa Amazônia Oriental	Soure, PA
Cavalo Marajoara e Puruca	Embrapa Amazônia Oriental	Soure, PA
Cavalo Pantaneiro	Embrapa Pantanal	Corumbá, MS
Cavalo Lavradeiro	Embrapa Roraima	Boa Vista, RR
Ovino Crioulo Lanado	Embrapa Pecuária Sul	Bagé, RS
Ovino Santa Inês	Embrapa Tabuleiros	Aracaju, SE; S. João do Piauí, PI;
	Costeiros, Meio Norte,	Boa Vista, RR; Sobral, CE
	Embrapa Roraima e	
	Embrapa Caprinos	
Ovino Bergamácia	UnB	Brasília, DF
Ovino Barriga Negra	Embrapa Roraima	Boa Vista, RR
Ovinos Morada Nova e Somalis Brasileira	Embrapa Caprinos e Ovinos	Sobral, CE
Ovinos Morada Nova e Rabo Largo	Sobral, CE	
Caprinos Canindé e Moxotó	EBDA/ UESB	Jequié/ Pilar, BA
Caprino Repartida	Embrapa Caprinos	Sobral, CE
Caprinos Azul e Marota	EBDA/UESB	Pilar, BA
Caprino Nambi	Embrapa Meio Norte	Castelo, PI
Suíno Moura	Embrapa Meio Norte	São João do Piauí, PI
Aves	Embrapa Suínos e Aves	Concórdia, SC
Caprinos Canindé e Moxotó	Embrapa Suínos e Aves	Concórdia, SC
	Embrapa Caprinos	Sobral, CE

Fonte: Mariante et al., 2011

Enfatiza-se que priorizar a conservação das raças brasileiras por meio somente da sua manutenção constitui uma noção limitada do termo. Estas devem ser contempladas com uma maior amplitude de recursos como sendo portadoras de genes que lhes permitem adaptação às condições específicas e capazes de originar produtos singulares. Devem ser buscadas informações precisas sobre o uso e desempenho desses animais em relação ao seu ambiente natural e seu sistema agrícola (características de adaptação, qualidade dos produtos, dentre outras), a fim de possibilitar uma avaliação rigorosa do seu valor como um recurso em potencial. Além disto, fatores sociais terão um papel determinante no lançamento de programas de conservação e a motivação dos criadores será

necessária para desenvolver nichos de mercado específicos (VERRIER et al., 2005).

No final do ano de 2012 mais uma raça local foi reconhecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) denominada de Curraleiro Pé Duro (CPD), concedendo à Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Curraleiro Pé-Duro (ABCPD) o direito de registro genealógico dos animais dessa raça permitindo que produtores possam contratar empréstimos bancários para a pecuária desta raça, que seja concedido o registro desses animais facilitando sua participação em parques de exposição, além de possibilitar que estes animais se tornem doadores de semên e embrião, isto tudo ocasionando mais rapidamente a saída do CPD do cadastro de animais em risco de extinção (CARVALHO, 2013a).

Ademais, a carne do gado CPD apresenta excelente sabor, o que somado à rusticidade da raça e do seu manejo com o mínimo de uso de medicamentos, permite a viabilidade da criação de um mercado diferenciado para essa carne. Possuem, da mesma forma, grande potencial para ocupar nichos de mercados específicos, como no caso de produtos com Indicação Geográfica (NEIVA et al., 2011). Um exemplo é a Associação Kalunga de Cavalcante (AKC), entidade detentora da tutela da IG Carne de Curraleiro Kalunga. Tais alternativas mercadológicas podem agregar valor aos produtos originados das raças brasileiras, tornando seu uso comercial mais atraente para o produtor (FELIX, 2013).

3.1.1 A raça CPD

3.1.1.1 Características gerais e adaptabilidade

A denominação Curraleiro Pé Duro (CPD) determinada há dois anos pelo MAPA teve origem da unificação da nomenclatura de duas “raças” pelas suas similaridades genéticas, o primeiro, “Curraleiro”, utilizado nos Estados de Tocantins e Goiás por sua criação em currais nas margens dos rios no século XVIII (LÍCIO, 1995) e o segundo, “Pé Duro”, como era conhecido nos Estados nordestinos Piauí e Maranhão, devido a sua adaptação ao solo pedregoso, ambiente onde animais de casco mole não conseguem sobreviver (CARVALHO, 2010).

Segundo Athanassof (1957) a raça CPD é descendente direto do gado da raça Mirandesa, a qual ainda pode ser encontrada na região de Trás-os-Montes em Portugal e mais particularmente da variedade Beiroa, que se encontra na Espanha,

na província de León. Entretanto, não se pode corroborar que apenas bovinos mirandeses tenham dado origem ao gado CPD, mas sim um conjunto de animais de diferentes grupos genéticos, que no Brasil Colonial ainda não eram estabelecidos como raças (CARVALHO; GIRÃO, 1999; CARVALHO et al., 2010).

Para Viana (1927) o CPD habitou todo território brasileiro sendo em parte formador da raça Caracu e de outras raças naturalizadas.

Comparando os estudos realizados acerca de características fenotípicas das raças comerciais taurinas e zebuínas, poucos trabalhos científicos foram realizados com a finalidade de se conhecer as características raciais dos bovinos crioulos do Brasil (CARVALHO et al., 2013).

Os padrões raciais do CPD são determinados pela Associação Brasileira de Criadores de Curraleiro Pé Duro (ABCPD) (Quadro 1- Anexo) a serem adotados para os animais, destaca-se que algumas características apresentam maior permissividade por tratar-se de rebanhos de conservação em recursos genéticos não tratando, portanto em atender somente às questões relacionados com o melhoramento genético e produção (ABCPD).

O CPD (*Bos taurus ibericus*) é uma raça naturalizada, apresenta pele grossa, diversos tipos de pelagem, variando de preta a vermelha, em suas diversas tonalidades e particularidades (óculos, ventre e ou dorso claro, rajado, cara branca (moura) e malhado, porém em sua maioria os animais possuem pelagem alaranjada, focinho preto, além de possuírem as orelhas pequenas, a barbela e o umbigo reduzidos e os chifres geralmente curtos em forma de coroa (DOMINGES et al., 1956; CARVALHO, 1985; CARVALHO et al., 2013) (FIGURA 2).

Evidencia-se por ser extremamente rústico, possuir grande longevidade, vivendo por mais de 20 anos, adultos apresentam peso médio de 284 kg para os machos e 210 kg para as fêmeas, apresenta pequeno porte com altura média de 1,10 m para os machos e 1,07 m para as fêmeas (CARVALHO et al., 2013).

Nos machos o prepúcio apresenta um tamanho reduzido e bem aderido ao ventre, diminuindo o acometimento de lesões físicas e mecânicas no membro (BRITTO; MELLO, 1999).

Embora os machos apresentem diferenças significativas em relação às fêmeas nas mensurações de largura da frente, comprimento do chifre, altura da cernelha, altura da garupa e na circunferência torácica, em outras medidas, como a

largura da orelha, altura da cabeça, espelho nasal, comprimento do corpo e largura da garupa, não há indicações de dimorfismo sexual (CARVALHO et al., 2013).



Figura 2. Gado Curraleiro Pé Duro e suas características raciais: cabeça pequena e orelhas pequenas, pescoço curto, linha dorso-lombar reta, cor da pelagem avermelhada a laranjada e extremidades mais escuras, principalmente nos machos. Fonte: Carvalho, G.M.C

As correlações fenotípicas analisadas por Carvalho et al. (2013) entre medidas morfométricas e o peso vivo em diferentes faixas etárias demonstraram que em qualquer idade durante o crescimento deve acarretar ganho de peso em pesagens posteriores e também aumento na estatura dos animais. Todavia faz-se importante recordar que um aumento no tamanho do bovino acarreta em maior necessidade nutricional deste animal, nem sempre disponível nas regiões mais secas, portanto deve-se focar a obtenção de animais com tamanho e peso adequados ao sistema de cada produção (CARVALHO, 2010).

O tamanho corporal de um animal pode apresentar vantagens biológicas importantes quanto aos aspectos relacionados à adaptação (RADOSTITS et al., 2002). O pequeno porte se destaca além da influência na menor necessidade nutricional, também como fator primordial na adaptação do animal às temperaturas elevadas. Considerado de menor porte comparado ao Nelore e ao Pantaneiro, o CPD apresenta maior superfície corporal por unidade de massa corporal ocorrendo maior troca de calor com o meio (SANTOS et al., 2005; BIANCHINI et al., 2006).

Em um estudo comparativo entre as raças CPD, Pantaneira e Nelore em relação à tolerância ao calor, realizado por Cardoso (2013) os CPDs apresentaram as menores temperaturas retais e superficiais em todos os dias e períodos, podendo ser considerada a raça mais adaptada em relação ao clima dentre as três analisadas.

[Digite texto]

Outro fator apaziguador do estresse térmico nos CPDs se dá em razão dos mesmos apresentarem maior porcentagem de área de tecido secretora das glândulas sudoríparas e uma maior taxa de transpiração se comparadas a outras raças como o Nelore (BIANCHINI et al., 2006).

Ao longo dos anos estes animais adaptaram-se gradualmente à seca, ao calor, às pastagens de qualidade e quantidade inferiores, provavelmente induzindo à ação da seleção natural ao seu pequeno porte. Ademais, docilidade, rusticidade, prolificidade são características predominantes nos CPDs, (CARVALHO, 2002) além de corresponderem a uma melhor relação custo x benefício para regiões secas que apresentam pastagens naturais com baixa produtividade (CARVALHO, 2002; EGITO, 2007). A sua adaptação secular às intempéries climáticas é bem demonstrado em textos do período colonial sobre a adaptação destes animais por um texto de Capistrano de Abreu (1982 p.234).

“Adquirida a terra para uma fazenda, o trabalho primeiro era acostumar o gado ao novo pasto, o que exigia algum tempo e bastante gente; depois ficava tudo entregue ao vaqueiro. (...)”.

Outras características inerentes incluem uma possível tolerância a algumas plantas tóxicas (CARVALHO et al., 2001), a presença ativa de parasitas (FIORAVANTI et al, 2010) além de demais fatores adversos presentes nas áreas de Caatinga, Sertão e como um todo o Nordeste do Brasil (BRITTO, 1998; CARVALHO, 2002; MARIANTE; CAVALCANTE, 2006).

Além de bem adaptado as difíceis condições das regiões mais secas, estudos indicam que estes animais podem responder bem aos bons tratamentos, tendo um ganho compensatório após o período seco como nenhuma outra raça bovina no Brasil (CARVALHO, 2002; CARVALHO et al., 2012).

Adicionado a estes argumentos segundo MacManus et al. (2008), caso se confirme as previsões de aquecimento global, o interesse e procura por raças adaptadas a climas quentes será incrementado e levará a uma reavaliação do valor das raças e dos cruzamentos estratégicos.

Ademais, a consideração à resistência ambiental e parasitológica do gado CPD, atualmente existe uma preocupação constante e crescente com a manutenção de ambientes livres de substâncias químicas, bem como em relação à presença de resíduos medicamentosos nos produtos de origem animal e a resistência de patógenos a algumas drogas (MORRIS, 2007), portanto a seleção

de raças, reprodutores e matrizes com o propósito de aumentar a resistência às doenças no sentido de reduzir a utilização de produtos nocivos ao ambiente e à saúde humana e animal tem sido incentivada (LEWIN, 1989) sendo uma tendência mundial de valorização cada vez maior dos produtos naturais (CARVALHO, 2002).

3.1.1.2 Relevância cultural

A criação das raças de uma determinada região tem forte ligação com a cultura local, durante séculos as raças têm sido formadas por seleção natural e artificial, de acordo com as condições ambientais e necessidades humanas (MAUDET et al, 2002).

As raças bovinas do Brasil, de maneira geral, possuem características únicas que devem ser preservadas para evitar o desaparecimento das mesmas e atender demandas futuras, acredita-se que a persistência de alguns criadores barristas foi a responsável pelo impedimento da extinção completa de algumas raças (MARIANTE; CAVALCANTE, 2006).

A importância da conservação do bovino CPD abrange o cunho científico, cultural, histórico e econômico. No século XVIII a pecuária teve um intenso impacto social atraindo o índio e o mameluco para a vida de vaqueiro, uma vez que se fazia na liberdade das pastagens, sem a regularidade da faina agrícola, possibilitando aos mais desprovidos a perspectivas de ascensão (PESSOA, 2003).

Atualmente, ainda nesse contexto, a reintrodução e a manutenção do CPD representa uma indiscutível alternativa sustentável de geração de renda com melhoria da qualidade de vida, desenvolvimento sustentável e manutenção da identidade de comunidades indígenas, quilombolas, interioranas e fazendas sustentáveis, pois além de fornecer carne, leite e animais de trabalho, apresenta baixo custo de produção e não exige grandes investimentos em infraestrutura na propriedade (BRITTO, 1998; SANTI, 2008) e, ao mesmo tempo, contribui para a conservação de um importante patrimônio genético do país (EGITO et al., 2002; ALMEIDA, 2008).

Exemplifica-se o interesse da maior comunidade remanescente de quilombo do Centro-Oeste, o Quilombola Kalunga, em conservar a raça CPD. Os quilombolas descrevem que o fazem pela tradição, pelo sabor e qualidade da carne, ficando evidente o caráter cultural e familiar da atividade com hereditariedade. Esta reintrodução do CPD no Sítio Histórico e Patrimônio

Quilombola Kalunga, foi um dos motivos que garantiu a permanência da população na zona rural em consequência da sua tutoria da Indicação Geográfica (IG) da Carne de Curraleiro Kalunga pela Associação Kalunga de Cavalcante (AKC) (FIORAVANTI et al., 2011).

Tais alternativas mercadológicas podem agregar valor aos produtos originados das raças brasileiras, tornando seu uso comercial mais atraente para o produtor (FELIX, 2013).

No cunho cultural, inclui-se a venda de gado para veículos de tração, uma tradição viva em festas religiosas e eventos culturais no estado de Goiás, como por exemplo, a Festa do Divino, na cidade de Trindade – Goiás (MAIA; COELHO, 2006; FIORAVANTI et al., 2011) sendo igualmente utilizados nas pequenas propriedades para o transporte de madeira e no escoamento da produção de milho nos campos (MAIA; COELHO, 2006). Outras festas culturais ocorrem igualmente no Estado do Maranhão, sendo um grande evento turístico da região.

Este animal possui também valor histórico para o Estado do Piauí que no passado foi um grande exportador de carne e couro para outras regiões, sendo na época a raça com maior número efetivo nesta região (MARIANTI, 1993). Entretanto por volta de 1811 as terras com alta pluviosidade foram destinadas à cultura de cana-de açúcar e o gado passou a ser criado somente em regiões de pluviosidade instável (BRITTO, 1998).

Esta importância foi claramente demonstrada em 2009 com a assinatura do decreto estadual reconhecendo a raça como patrimônio histórico e cultural do Estado do Piauí, facilitando os trâmites para o processo de registro da raça ser realizado.

Além disso, segundo Carvalho (2002) o sistema de pastejo extensivo como manejo aos CPD, aplicado em regiões de vegetação nativa pode ser eficaz na prevenção de incêndios, bem como, desempenham um papel importante na manutenção da população nas áreas rurais, onde as atividades econômicas são limitadas pela distância e falta de infraestrutura.

3.1.1.3 Particularidades imunológicas

Em conjunto com as múltiplas aptidões do CPD há a conjectura que nessas populações podem conter alelos conferindo resistência a algumas doenças (WOOLLIAMS et al.,1986) além de estudos que corroboram a possibilidade de resposta imunológica mais eficiente (LOBO, 2009).

JULIANO (2006) expôs em seu trabalho através da técnica de ELISA que bovinos CPDs apresentaram uma alta soropositividade (38,24%) para *Neospora caninum*, sendo esta prevalência superior aos registrados na literatura para outras raças, entretanto não houve relatos de surtos de abortamentos. Foi observado também que a ocorrência de diarreias em bezerros era comum, porém os animais se recuperavam e a mortalidade inespecífica foi estimada em somente 1% a 2%.

Ademais em um estudo comparativo dos valores médios da quantificação, através do ELISA indireto, das imunoglobulinas M (IgM) e imunoglobulinas G (IgG) após vacinação com *Mycobacterium bovis* - BCG. Foi observado que os bezerros CPD mantiveram valores superiores aos bezerros Nelore. Tanto na avaliação da resposta imune humoral menos específica (IgM) quanto mais específica (IgG) os CPDs foram mais eficientes em produzir quantidades maiores de anticorpos, estes resultados apresentados por estes animais reforçam a existência de uma provável resistência natural, fato que pode ser atribuído a sua rusticidade (LOBO, 2009).

Há indícios ainda que os bovinos CPDs apresentam imunidade contra os agentes da babesiose (*Babesia bovis* e *B.bigemina*) e leptospirose (*Leptospira interrogans*), sem manifestação clínica da doença, não havendo alteração hematológica que indique algum estado mórbido, sugerindo haver resistência ou adaptação suficiente do hospedeiro sendo este um atributo particularmente importante nos sistemas de produção na pecuária (GIBSON, 2002).

Estes estudos podem trazer grandes contribuições aos programas de melhoramento genético (RANGEL et al. 2004), reforçando a necessidade de preservação do bovino CPD por se constituir instrumento para melhorar a rusticidade dos bovinos de alta produtividade (EGITO, et al., 2002).

A comprovação da resposta imunológica dos animais a uma só doença, a princípio, parece não estar relacionada à resistência a outras enfermidades. Contudo, a sinalização e ativação de algumas vias das células do hospedeiro podem ter similaridades relacionadas à sobrevivência ou não de patógenos

intracelulares (ADAMS; TEMPLETON, 1998). Alguns estudos confirmaram a resistência genética de touro Black Angus, *in vitro* e *in vivo* quando desafiado pela *Brucella abortus*. Posteriormente este animal foi clonado e seu clone demonstrou ser resistente também a *Mycobacterium bovis* e *Salmonella typhimurium* (WESTHUSIN et al., 2007).

A associação da resistência genética com outras medidas de controle como vacinação ou utilização de medicamentos, reduz o tamanho do desafio enfrentado pelo animal ou auxilia no tratamento das infecções existentes (MORRIS, 2007).

Portanto, destacando o atual enfoque dado para a multiplicação de ambientes e produtos de origem animal livres de substâncias químicas e de resíduos medicamentosos, e da resistência de patógenos a algumas drogas (MORRIS, 2007), torna-se naturalmente viável a seleção de raças e/ou reprodutores com o propósito de aumentar a resistência genética às doenças no sentido de serem reduzidas a utilização de produtos nocivos ao ambiente e à saúde humana e animal (LEWIN, 1989).

3.2 Leucose Enzoótica Bovina (LEB)

3.2.1 Etiologia do vírus da LEB

Várias são as enfermidades que acarretam prejuízos econômicos para bovinocultura, dentre as doenças provocadas por vírus podemos citar a Leucose Enzoótica Bovina (LEB), reconhecida universalmente desde 1968 (MILLER et al., 1969).

O agente causador da LEB é um retrovírus pertencente ao gênero Deltaretrovírus e à família Retroviridae, subfamília Oncovirinae. É caracterizado por propriedades de transformação de uma única proteína de regulação viral, a Tax, que pode transativar ambos os genes virais e celulares (VAN REGENMORTEL et al., 2000).

A natureza infecciosa deste vírus foi esclarecida em 1965 e posteriormente em 1969 ocorreu a identificação de etiologia viral (MILLER et al., 1969). É um retrovírus intimamente relacionado com o vírus de leucemia de células T humanas no que se refere a sua organização genérica e no seu ciclo de vida (MIRSKY et al., 1998).

O vírion é esférico, apresenta um diâmetro de 80-130nm, em seu interior possui duas moléculas de RNA de cadeia simples, estabilizados mediante interação com uma nucleoproteína p12 (nucleocapsídeo) este complexo está

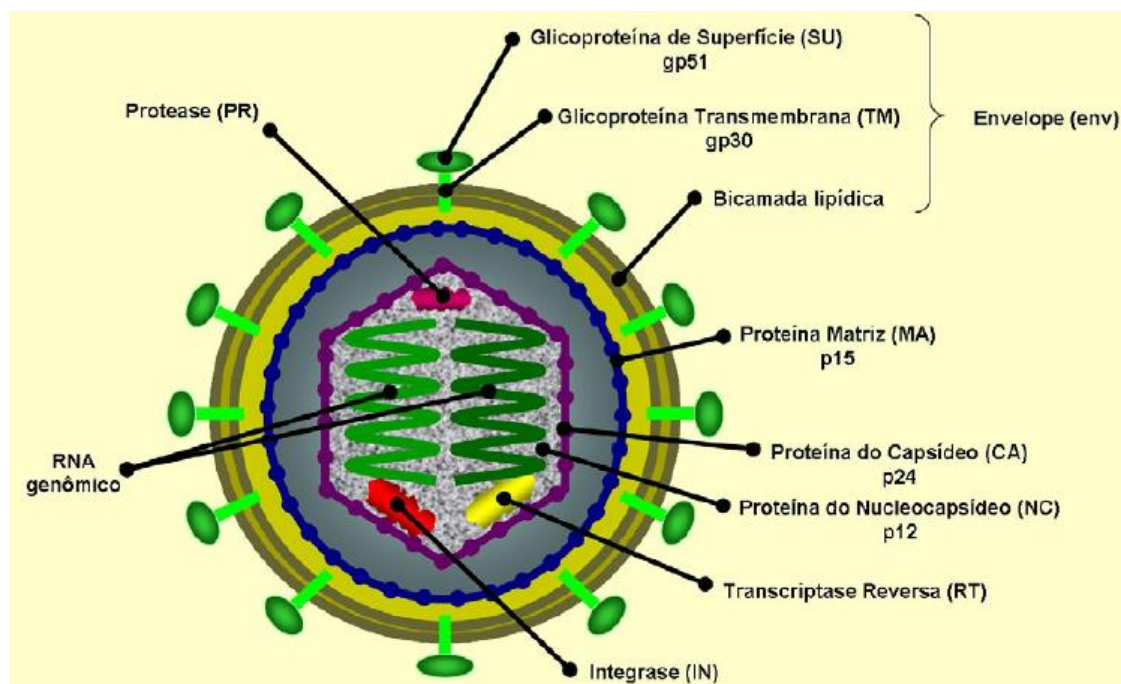


Figura 3 Esquema representando a partícula viral do Vírus da Leucose Bovina. Fonte: Adaptado de Burny et al., 1988.

rodeado pelo capsídeo que apresenta simetria icosaédrica sendo envolvido pelo envelope derivado da membrana celular do hospedeiro, onde se observam projeções de glicoproteínas (LUDERS, 2001) (FIGURA 3).

A composição química deste vírion se baseia em 35% de lipídeos, 2,2% de ácido nucleico, 0,5% de carboidratos e 60% de proteína, estas últimas identificadas como proteínas estruturais não glicosiladas (MUSSGAY et al., 1978).

As glicoproteínas (gp) e a retrotranscriptase demonstradas por peso molecular através de eletroforese em gel de poliácridamida (MILLER; VAN DER MAATEN, 1982) são determinantes para a resposta imunológica no hospedeiro, portanto a maioria das reações sorológicas incluem as glicoproteínas nos testes de diagnóstico (STRAUB, 1981) sendo utilizadas no desenvolvimento do teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA) que detecta anticorpos em animais infectados pelo Vírus da Leucose Enzoótica Bovina (VLEB), desenvolvido por MILLER; VAN DE MAATEN (1977).

A principal proteína interna, denominada de capsídeo, tem peso molecular aproximado de 24 KD, sendo referida como p24 (GILDEN et al., 1975) enquanto

[Digite texto]

para BURNY et al. (1978) as glicoproteínas mais comuns são as localizadas na superfície externa do envelope viral semelhantes a ganchos, possuindo pesos moleculares entre 45 e 70 KD, sendo a principal delas a gp51 (PM 51KD).

A fita de RNA do vírus pode ser dividida em três regiões bem definidas, denominadas de gene *gag* (antígeno grupo específico), *pol* (polimerase) e *env* (envelope) adiciona-se uma quarta região na subfamília *Oncovirinae*, a gene *sarc* (sarcoma) ou *onc* (oncogene). Estes componentes da estrutura genômica contêm toda a informação genética das quais as proteínas virais são derivadas, onde *gag* codifica as proteínas estruturais; *pol* a transcriptase reversa; *env* as glico-proteínas do envelope e *sarc* (*onc*) os fatores implicados nos fenômenos da alteração celular (JAWETZ et al., 1992; FENNER et al., 1993).

O VLEB é sensível à ação de solventes, detergentes lipídicos, como álcool, éter e clorofórmio, ao congelamento e ao calor em temperatura de 56°C durante 30 minutos, sendo relativamente mais resistente à luz ultravioleta, radiações-X do que outros vírus, provavelmente devido ao seu genoma diplóide (DONOVAN, 2003; SHIMIZU et al., 2004).

Durante a infecção inicial, o vírus libera todo seu conteúdo no citoplasma dos linfócitos, onde a enzima transcriptase reversa produz um vírus DNA a partir do modelo RNA vírico. A dupla fita de DNA linear migra para o núcleo e integra-se no genoma do hospedeiro pela ação de uma integrase viral, este provírus manipula a estrutura celular para a transcrição primária do RNA genômico além de causar uma transformação tumoral (VAN REGENEL, 2000). Parte do RNA viral sintetizado é processada para gerar o RNAm que será traduzido nas proteínas virais apropriadas no citoplasma. Finalizando a infecção, o vírus é constituído e liberado para o meio extracelular (SEIKI et al., 1984).

O vírus poderá permanecer apenas em estágio latente, sendo o animal um transmissor passivo do VLEB, sem apresentar a LP e ou os linfossarcomas, cujo desenvolvimento é determinado pela constituição genética do hospedeiro (RADOSTITS et al., 2002).

3.2.2 Epidemiologia do vírus

A LEB é uma enfermidade infectocontagiosa sendo descrita pela primeira vez no ano de 1861 na Alemanha por Leisering, ao descrever nódulos neoplásicos de origem linfoide em um baço de vaca (FERNANDES, 2012).

Considera-se que a Europa seja o berço da infecção e acredita-se que a doença tenha sua origem na região de Memel, situada na Prússia Oriental, dissipando-se para o oeste com o passar dos anos. Em 1878, Siedamgrotsky elaborou a primeira descrição desta doença, mas foram Smith e Wolkmann, em 1916, e Dutoit, no mesmo ano, que a descreveram com maior perfeição. Em 1934, Schottler levantou a questão da sua contagiosidade (DITTRICH, 2004).

Após a segunda guerra mundial foram realizados numerosos relatos da LEB em praticamente todos os países da Europa Oriental. Animais importados da região do mar Báltico, no final do século XIX, introduziram o vírus nos rebanhos bovinos dos Estados Unidos da América disseminando-se igualmente para os rebanhos canadenses, daí em diante, a importação de animais destes dois países disseminou o VLB para o restante do mundo (FELDMAN, 1928; SCHOTTLER; SCHOTTLER, 1934; SORENSEN, 1961; LEISERING, 1871; JOHNSON; KANEENE, 1992).

No início do século passado a LEB foi muito estudada devido a sua alta incidência nas regiões do leste da Europa, atualmente, a LEB está quase erradicada na União Européia (Bélgica, Holanda, Dinamarca, Alemanha, França, Grã-Bretanha, Áustria, Finlândia (GILLET et al., 2007), sendo esporadicamente encontrada em alguns países (Itália, Portugal, Lituânia, Letónia, Estónia (POLETTTO, 2004) mas, sua prevalência é alta em outras regiões do mundo.

Esta enfermidade está presente também em outros Países da América Latina: 50% na Argentina, 14% na Colômbia, 28% na Costa Rica, 36% no México e de 24% no Peru (BRUNEL et al., 1981; CHUNG, 1983; PENA et al., 1985; DUCREUX et al., 1987).

No Brasil, o primeiro caso descrito foi em 1943 quando sua etiopatogenia foi descrita por Rangel e Machado em Minas Gerais, onde foram identificados neoplasias em animais domésticos com casos de linfossarcoma em bovinos (RANGEL; MACHADO, 1943). Entretanto o reconhecimento científico da ocorrência da enfermidade só ocorreu em 1959 (SANTOS et al., 1959).

Segundo FAVA; PITUCO (2004) Atualmente a LEB é amplamente distribuída em fazendas brasileiras, especialmente nas possuidoras de rebanho leiteiro (TABELA 2-ANEXO). Em muitos estados brasileiros inquéritos sorológicos mostraram altas taxas de infecção pelo VLEB: (CARNEIRO, 2000; BIRGEL JUNIOR, 2001; MATOS; BIRGEL JUNIOR, 2005; CAMARGOS et al., 2007) com taxas de ocorrência que variam de 2,1% (MEAS et al., 2002) a 81,1% (MEIRELLES et al., 2009).

A introdução do Vírus da Leucose Bovina (VLEB) em rebanhos brasileiros foi atribuída à importação indiscriminada de bovinos do hemisfério norte por pecuaristas de gado de elite das regiões Sudeste e Sul. Uma vez estabelecida, nessas regiões, a LEB se disseminou para as regiões Norte e Nordeste favorecida pelo trânsito intenso de animais e, principalmente, pela ausência de uma política sanitária visando combater a disseminação da doença em território nacional (CARNEIRO, 2003).

Este vírus em condições naturais infectam bovinos, zebuínos, búfalos e capivaras, experimentalmente, os animais susceptíveis são o ovino, o caprino e o coelho (FLORES, 2007), acarretando nestes uma diminuição na eficiência produtiva, reprodutiva, maior predisposição a outras doenças e morte dos animais (DA et al., 1993, D'ANGELINO et al., 1998).

Ademais, a maioria dos países importadores tem como protocolo, uma rigorosa inspeção na importação dos animais e seus subprodutos em relação à LEB, sendo de praxe a execução na detecção de traços de linfócitos infectados pelo VLEB inclusive nos produtos lácteos, em razão da maior prevalência da enfermidade em bovinos leiteiros (FELMER et al., 2006) portanto, desencadeando uma extensa lista de impactos econômicos (TIWARI et al., 2007).

Corresponde a uma enfermidade com longo período de incubação seguida por evolução crônica, neoplásica de caráter infeccioso e plurissintomática afetando particularmente a linhagem celular linfoide dos animais acometidos (SCHWARTZ; LEVY, 1994).

A LEB caracteriza-se por um período curto de viremia pós-infecção, seguido por um longo período de incubação (de dois a cinco anos) até o aparecimento de sinais clínicos. Após um intervalo de 10 a 12 dias, partículas virais estão presentes na corrente sanguínea induzindo uma resposta imune humoral,

com produção de anticorpos específicos para as proteínas virais p24 e gp51 (FERRER; PIPER, 1981).

Sem exceção, todos os bovinos infectados com o VLEB desenvolvem anticorpos, entretanto apenas alguns apresentam sinais clínicos ou patológicos da doença (FERRER; PIPER, 1981; FERRER, 1982) por isso, apesar da LEB corresponder à neoplasia de maior incidência em bovinos de leite, acometendo ocasionalmente o gado de corte (BARROS, 2007) é uma doença negligenciada devido a pequena quantidade de animais clinicamente afetados (TROIANO, 2009).

A enfermidade pode causar baixa na defesa imune humoral, devido ao decréscimo de imunoglobulinas, principalmente IgM, desenvolver linfocitose persistente (LP) uma proliferação dos linfócitos e linfossarcoma (LUDERS, 2001). Este efeito imunossupressivo pode interferir na qualidade da resposta a antígenos vacinais, mantendo-os em condições inadequadas frente às possíveis infecções, podendo atuar como fator de risco de ocorrência da Tuberculose (MENDES et al., 2008) e à mastite bovina (GARCIA et al., 1995) além de interferir no resultado de exames laboratoriais indiretos que necessitam de um desempenho do sistema imunitário, contribuindo para a perpetuação de enfermidades no rebanho com a presença não diagnosticada dos portadores disseminando agentes infecciosos a animais sadios, além de predispor o animal a diversas outras doenças (BRAGA, 1998).

Com o avançar da idade a taxa viral aumenta, tanto pelo fato da infecção ter um caráter crônico como o animal ter um maior tempo de contato com os animais do rebanho (FAVA; PITUCO, 2004).

3.2.3 Transmissibilidade

Na pecuária atual, a transmissão do VLEB ocorre especialmente pela via horizontal, através da transferência iatrogênica de linfócitos infectados pelo uso indiscriminado de instrumentos de descorna, tatuagem e agulhas sem a devida desinfecção (TIWARI et al., 2009), portanto procedimentos veterinários de rotina e métodos de manejo são causas importantes na transmissão do vírus doença. Deste modo, a enfermidade dever ser mais prevalente em rebanhos onde há um manejo mais intensificado com manipulações mais intensas, facilitando as formas

de transmissão horizontal, compatível com o manejo realizado em rebanhos produtores de leite (SARGEANT et al., 1997).

As portas de entrada do VLEB, incluem a via intradérmica, intramuscular, subcutânea, intravenosa (EVERMAN et al., 1986), oral, intraperitoneal (MILLER et al., 1972), intratraqueal, intra-uterina (ROBERTS et al., 1982) e intra-retal (HOPKINS, 1988).

O VLEB não tem sido encontrado livre da célula, no sangue dos animais infectados, é restrito ao linfócito (KETTMANN et al., 1978) logo, há ausência de infectividade do plasma, mesmo com a ocorrência de uma viremia, a transmissibilidade deste vírus em relação a outros vírus acometidos em bovinos torna-se rara (ROMERO et al., 1982; TROIANO, 2009) e a possibilidade de transmissão do vírus parece ser maior com sangue de animais com linfocitose persistente (ITOHARA et al., 1985).

Tanto os animais assintomáticos quanto os que apresentam sinais clínicos são capazes de eliminar o agente por meio das excreções e secreções corporais, envolvendo secreções nasais e traqueais, urina e principalmente, sangue, leite e saliva. Foi demonstrado que apenas 0,1µL de sangue (4.524 linfócitos), quando inoculado via intradérmica é capaz de causar infecção em bovinos (KLINTEVALL, 1994) e que em condições normais, devido a concentração de componentes celulares, a transmissão pelo sangue é mais frequente do que pelo colostro e leite (JOHNSON; KANEENE, 1992).

Em condições naturais, a infecção intra-uterina é infrequente ocorrendo em cerca de 1,2 a 6,4% dos animais nascidos de vacas infectadas (MEÃS et al., 2002) entretanto foram encontradas por Buehring et al. (1994) partículas virais no colostro e no leite das fêmeas infectadas, permitindo portando a doença ser transmitida de mãe para filho ou para qualquer outra cria que faça a ingestão do colostro.

A transmissão do VLEB durante a gestação, via de regra ocorre após o primeiro trimestre. As vacas com alta viremia e baixo título de anticorpos podem transmitir a infecção ao feto. Entretanto, fêmeas com baixa viremia e um alto título de anticorpos, promovem a transferência de imunidade para os fetos, a qual permanece por alguns meses (JACOBSEN, 1983).

A inseminação artificial e a transferência de embriões intactos não são consideradas como métodos comuns de transmissão da doença. Muitos pesquisadores cometeram equívocos ao afirmar a presença do vírus no sêmen

(RADOSTITS et al., 2002) entretanto, o mais provável seria considerar o sêmen como fonte de contaminação quando exposto a linfócitos infectados no processo de inseminação artificial, porém deve-se atentar que doenças do trato genital que ocorrem frequentemente e coletas de sêmen mais traumáticas como a massagem da uretra do doador positivo e das glândulas acessórias retal é feita levam a processos inflamatórios nas membranas mucosas do prepúcio e/ou órgãos internos, durante os quais capilares sanguíneos rompem-se e a migração de leucócitos para os tecidos afetados (JOHNSON; KANEENE, 1992).

Estudos realizados demonstraram que a inseminação artificial com sêmen processado não possui risco de infecção para a progênie ou vaca inseminada (MONKE, 1986; CHOI et al., 2002) pois, neste tipo de protocolo reprodutivo a qualidade do sêmen e os leucócitos são analisados, sendo que uma elevada concentração destas células é motivo de descarte. Como o vírus está presente apenas nos linfócitos, esta medida reduz as chances da presença do vírus no sêmen. Além disso, o ejaculado é diluído 50 vezes ou mais durante o processamento, reduzindo a concentração deste tipo de células que poderiam estar presente em uma dose de sêmen (PELZER; SPRECHER, 1993).

Neste sentido, foram interessantes as observações de Tekes et al. (1984) que, nos rebanhos onde haviam-se colocado machos da raça Frísia-holandesa, com o objetivo de melhoramento genético, todos apresentaram-se infectados, entretanto estavam livres da infecção aqueles rebanhos onde sêmen diluído dos mesmos machos era utilizado para a inseminação artificial.

A premunicação contra *Anaplasma* e *Babesia* sp. também exerce um importante papel na difusão do vírus, pela inoculação de sangue fresco quando animais infectados são utilizados (FLORES et al., 1992).

Perino et al. (1990), relataram a transmissão do VLEB por insetos hematófagos (tabanídeos, moscas picadoras e carrapatos infectados) em numerosos rebanhos com grande percentual de animais infectados adicionada a alta população de insetos. A difusão também foi relacionada diretamente com a sazonalidade, sendo mais intensa no verão e em regiões tropicais (MANET et al., 1989).

3.2.4 Patologia e sintomatologia

O agente etiológico da LEB corresponde a um vírus RNA tumoral linfotrópico B, entretanto ocasionalmente detectado em células T, monócitos e granulócitos (SILVA et al., 2008).

O processo infeccioso ocorre devido à interação entre a glicoproteína viral e um receptor da superfície celular, a inserção ocorre entre os receptores específicos da superfície celular e as glicoproteínas do envelope viral (gp51 e gp30). A glicoproteína externa, gp51, unifica o vírus aos linfócitos B e é responsável pela infectividade do vírus e pela etapa inicial da infecção ademais, a glicoproteína, gp30, ancora o envelope do vírus na membrana plasmática da célula alvo (SUZUKI et al., 1998).

A infecção pelo VLEB induz ao aparecimento de leucocitose com linfocitose persistente em aproximadamente 30% dos animais infectados, que não apresentam nenhuma evidência clínica. Entretanto, 0,5 a 5,0% dos bovinos infectados, com idade entre quatro a oito anos, apresentam a forma tumoral da doença, com o desenvolvimento de linfossarcomas (JULIANO et al., 2014).

Via de regra os vírus possuem a habilidade de desenvolverem estratégias a fim de neutralizar a resposta apoptótica das células do hospedeiro e acredita-se que a modulação da apoptose, associada ou não ao aumento da taxa de proliferação celular, possa ser componente fundamental na persistência viral e na progressão para linfocitose induzida pelo retrovírus (SPILONA, 2010).

A persistência da infecção ocorre associada à diferença da expressão de antígenos virais nas células infectadas que resulta na eliminação das células que os expressam (FLORINS et al., 2007; GILLET et al., 2007). Este fato é primordial visto que logo após a infecção, a atividade da resposta humoral e citotóxica são capazes de abolir a replicação viral, permitindo apenas a expansão clonal das células portadoras do provírus, o que justifica a maior proliferação de linfócitos de se restringir apenas aos estágios iniciais da infecção. Podendo sugerir que o desenvolvimento da LP deve-se à redução da apoptose pelas células B, e a maior proliferação linfocitária podendo se restringir apenas ao estágio inicial do desenvolvimento da LP (SPINOLA, 2010).

No sangue periférico, proporcionalmente existem 70% de linfócitos do tipo T, 20% de Linfócitos B e 10% de linfócitos não diferenciados. Em bovinos com a

linfocitose persistente, exibem um fascinante aumento para 97% nos valores de Linfócitos B na circulação periférica (BIRGEL JUNIOR, 1991), principal população de leucócitos infectada predispondo os bovinos ao linfossarcoma (MIRSKY, 1998).

A frequência aproximada com que os sinais clínicos aparecem é: 80 % de perda de peso; 77 % de redução na produção de leite; 58 % de linfadenopatia externa; 52 % de anorexia; 43 % de linfadenopatia interna; 41 % de paresia posterior; 23 % de febre; 14,3 % de comprometimento respiratório; 13,2 % de exoftalmia bilateral; 7,4 % de exoftalmia unilateral; 12,7 % de diarreia; 8,7 % de constipação e 7 % de comprometimento cardiovascular (RADOSTITS et al., 2002).

A principal característica visualmente perceptível da LEB se baseia no aumento dos linfonodos do animal, sendo comuns na região retrobulbar, resultando em exoftalmia uni ou bilateral, e na área faríngea, acarretando disfagia e estertores durante a respiração (BRAGA, 1998).

A forma entérica da doença é caracterizada pelo alargamento da submucosa do abomaso, podendo existir envolvimento dos linfonodos mesentéricos associados com esta infiltração, apresentam-se com volume suficiente para causar obstrução (VALLI, 1993).

Na forma cardíaca é possível observar infiltração no miocárdio além de envolvimento do átrio direito, preferencialmente na região de deposição de gordura do epicárdio (VALLI, 1993).

Massas tumorais de coloração branca e aspecto firme podem ser encontradas em qualquer órgão, caracterizados por infiltração mononuclear em órgãos ricos de tecido retículo-histiocitário, comumente os linfonodos, o baço, o coração, o útero, o abomaso, o fígado e/ou os rins, olho e medula espinhal, acarretando diversos transtornos ao organismo pelos órgãos perderem as características primárias e sendo progressivamente substituídos por um novo tecido de natureza neoplásica (MATSUOKA; JEANG, 2007).

Dependendo dos órgãos ou sistemas afetados pela presença dos tumores, as manifestações clínicas podem variar de acordo com as anormalidades circulatórias, respiratórias, digestivas, reprodutivas, urinárias e neurológicas tendo previamente apresentado ou não linfocitose persistente sendo que o abomaso, o coração e a medula são os órgãos geralmente envolvidos (COCKERELL; REYES, 2000).

Ademais outros sintomas clínicos evidentes incluem a adenomegalia, incoordenação e paralisia dos membros posteriores, baixa produção leiteira, perda de peso progressiva e caquexia, levando à morte do animal (BRAGA, 1998). Além disso, quando os tumores se localizam nas paredes uterinas ocorre obstrução retal e, em raros casos, abortos ocorrendo em períodos mais adiantados da gestação (STRAUB, 1981).

As lesões microscópicas consistem em infiltrações nodulares ou difusas de células linfóides nos órgãos atingidos (BLOOD; RADOSTITS, 1991).

3.2.5 Diagnóstico

Com a alta incidência da enfermidade no leste europeu no século passado, inúmeros pesquisadores descreveram métodos que indicavam o seu diagnóstico precoce a fim de promover a erradicação da mesma nos rebanhos leiteiros da região através da relevância da hematologia, particularmente a leucometria como ferramenta clínico epidemiológica estratégica à LEB podendo ser constatada desde antes do descobrimento da natureza viral da enfermidade (BIRGEL JUNIOR, 1991).

Os pioneiros a descrever um método de diagnóstico da LEB correlacionando alterações hematológicas com a doença, indicaram a presença de linfócitos atípicos (GOTZE et al., 1954; BIRGEL JUNIOR, 1991) a partir destes estudos foram convencionadas algumas normas de diagnóstico hematológico para LEB influentes até a atualidade, as chamadas chaves leucométricas de Gotze, Bendixen (1959), Tolle (1965) e Mammerick (1978) (SPINOLA, 2010; FERNANDES, 2012).

Após o estabelecimento das chaves muitos autores dedicaram-se a sua aplicabilidade no controle da doença, inclusive no Brasil, onde alguns autores reconheceram o seu uso e outros a contestaram (BIRGEL JUNIOR,1991).

Por fim, constata-se que não há um consenso sobre as características específicas das atipias hematológicas no que se diz respeito à enfermidade, resultado de uma diferenciação no padrão hematológico dos animais atualmente expostos a uma maior diversidade antigênica adicionada a uma evolução do vírus e uma diferenciação dos sistemas de criação, além das chaves leucométricas serem muito antigas (SPINOLA, 2010).

Atualmente o que se faz uso em relação a contagem de linfócitos no exame de sangue, é a revelação de uma leucocitose com linfocitose persistente (LP) com o aumento no número de linfócitos B. Entretanto, a ausência da mesma não exclui a possibilidade de infecção (BARROS, 2007), pois a sua ocorrência se dá em somente 30% dos casos (FLORES, 1989).

Enquanto na Europa o enfoque principal eram as chaves leucométricas, nos Estados Unidos, os pesquisadores emanaram mais os estudos na cultura de linhagens celulares com o intuito da replicação do VLEB in vitro (VAN DER MAATEN et al., 1974). Foi produzido o vírus através de co-cultivo e por persistentes infecções com linfócitos, em células fetais de rim de carneiro (Fetal Lamb Kidney –FLK) formando a linhagem FLK-BLV. Após o isolamento e cultivo do VLEB, foram desenvolvidas algumas metodologias para a detecção dos anticorpos nos animais (EVERMANN et al., 1992).

No final dos anos 70 a FLK-BLV foi trazida ao Brasil (DITTRICH, 2004) para a produção do vírus e suas linhagens preexistentes gerando novas linhagens correspondentes, esta linhagem celular continua sendo utilizada para produção do antígeno VLB em kits de teste diagnóstico (ALTANER et al., 1985; MAMOUN et al., 1990; WAGNER et al., 1995).

Atualmente a suspeita do diagnóstico clínico da enfermidade se dá quando há aumento de linfonodos superficiais, exoftalmia, perturbações digestivas crônicas e mais raramente, paresia, paralisia e placas cutâneas (LUDERS, 2001).

Adicionado as características físicas aparentes os animais acometidos pelo VLEB desenvolvem anticorpos tipo IgM, IgG e IgA que podem ser identificados em testes sorológicos, denominados testes indiretos.

O teste de Imunodifusão em Gel de Agarose (IDGA), padrão –ouro pela OIE, detecta anticorpos no plasma ou no soro contra as glicoproteínas gp51 e gp30 do vírus sendo o teste mais adotado pelos órgãos de defesa sanitária de vários países, como teste oficial pela OIE para diagnosticar a infecção pelo VLB (EVERMANN, 1992).

O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) pode ser usado tanto em amostras sanguíneas como em amostras de leite, sendo mais sensível que o teste IDGA, detectando também anticorpos em rebanhos com prevalência do VLEB inferior a 1%. Este teste é baseado na utilização de proteínas virais, parcialmente purificadas e específicas (DOLZ; MORENO, 1999).

A base para a o uso das técnicas sorológicas, se enquadra na perspectiva de que o animal infectado com o VLEB permanece portador do mesmo durante a vida toda e sempre possuirá anticorpos como resposta imunológica ao vírus e, portanto reagente nos testes realizados (FAVA; PITUCO, 2004).

Outro meio de diagnóstico para a LEB inclui a técnica direta para pesquisa de antígeno viral do BLV. Recomendada pela Organização Mundial de Saúde Animal, uma delas é a PCR, capaz de detectar precocemente, até duas semanas após a infecção o DNA proviral integrado no genoma da célula hospedeira em diversos tipos de material clínico, como sangue total, linfócitos, órgãos e tecidos neoplásicos e sêmen (OIE, 2003). A outra corresponde a Imunohistoquímica, realizada a partir de cortes histológicos de material suspeito de fragmentos de órgãos obtidos através de biópsia ou necropsia conduzem a um diagnóstico preciso da enfermidade (SHINAGAWA et al., 1994).

Os métodos diretos e os indiretos disponíveis para o diagnóstico do BLV possuem vantagens e desvantagens. Segundo o trabalho desenvolvido por Martin et al. (2001), para a pesquisa de anticorpos, tanto o ELISA quanto a IDGA são adequados para a rotina diagnóstica, no entanto, observaram que o teste de ELISA detectou 12% mais indivíduos sororeagentes que a IDGA. Para a pesquisa do vírus em si, estes autores verificaram que a PCR detectou 6% mais animais positivos do que o ELISA, porém salientam que pode ocorrer resultado negativo ao PCR em animais sororeagentes ao IDGA e ELISA. De acordo com esses resultados, estes autores recomendam realizar tanto teste direto quanto indireto, isto é, os animais seriam inicialmente submetidos à triagem pela IDGA ou ELISA, por último, submetê-los à PCR e interpretar os resultados conjuntamente. Salienta-se que não há 100% de concordância entre os testes, por este motivo os testes diretos e indiretos se complementam e algumas vezes os resultados interpretados de uma maneira isolada são difíceis de se comparar (FAVA; PITUCO, 2004).

A quantidade de anticorpos presentes no sangue pode ser influenciada por flutuações no número de linfócitos infectados e/ou cópias do provírus (GUTIERREZ et al., 2001; ROLA; KUZMAK, 2002), localização dos linfócitos infectados (KLINTEVALL et al., 1994) e variação no provírus (FECHNER et al., 1997).

A infecção recente do animal, o período de incubação da doença (FAVA; PITUCO, 2004; KUCKLEBURG et al., 2003), o período de pré e pós-parto (CAMARGOS et al., 2005) e a presença de genótipos associados à resposta imune

humoral (FECHNER et al., 1997) também podem explicar falhas na detecção do vírus em exames.

Para impedir reações falso-negativas, as vacas não devem ser testadas com exames indiretos no período de três semanas que antecedem ao parto e até três semanas após (RAMA, 2009), bovinos com resultados negativos devem ser retestados após três meses, para isso os programas de controle incluem testes sequenciais de diagnóstico para infecções recentes em bezerros, que devem ser realizados após os sete meses, tempo necessário para os anticorpos transferidos pela mãe desaparecerem (PELZER; SPRECHER, 1993; TROIANO, 2009).

Com a realização da necropsia observam-se nos animais acometidos da leucose enzoótica bovina, formações tumorais em tecidos linfóides do tipo linfossarcoma (BRAGA, 1998) com dimensões crescentes, ao corte os linfonodos apresentam superfície branco amarelado, em distinção entre cortical e medular. Massas tumorais com o mesmo aspecto podem ser encontradas no coração, rins, intestinos, abomaso, medula espinhal e útero. Histologicamente há uma proliferação das células da linhagem linfocítica e infiltração maciça dessas células nos órgãos afetados (FLORES, 2007).

3.2.6 Controle e Erradicação

Diferentemente dos países europeus, no Brasil não existe nenhum programa oficial específico para a prevenção desta enfermidade. Entretanto o Ministério da Agricultura colabora com tentativas de programas de controle, através do impedimento de compra e entrada no país de animais sorologicamente positivos para VLEB.

Ademais, o desconhecimento da enfermidade pelos produtores e o fato da infecção permanecer inaparente na maioria dos casos, fazem com que os proprietários não manifestem interesse em controlar ou erradicar a LEB (LEITE et al., 2001).

Primeiramente há a necessidade de uma identificação acurada dos animais infectados e não infectados através de um teste laboratorial e eficaz principalmente, os procedimentos necessários para o controle da infecção devem ser economicamente possíveis medidas estas tais como identificação, isolamento e eliminação dos animais reagentes (SILVA et al., 2008).

A realização de testes sorológicos nos animais com idade superior a seis meses, e repetição semestral, permite identificar os animais positivos e auxiliar no controle da doença (SILVA et al.,2008). As propriedades livres devem adotar medidas para evitar a introdução onde todos os animais a serem inclusos no rebanho devem ser testados (FLORES, 2007).

Recomenda-se fornecer para os bezerros colostro e leite de vacas não infectadas pelo BLV, ou que tenha sido fervidos por um período de 30 minutos em 56°C (JOHNSON; KANEENE, 1992).

Indica-se também, realizar a desinfecção de instrumentos cirúrgicos e equipamentos como seringas, agulhas, tatuadores, aplicadores de brincos, instrumentos de castração e descorna (JOHNSON; KANEENE, 1992).

Atualmente não há nenhuma vacina efetiva que confira proteção contra o VLB bem como tratamento viável e efetivo (BIRGEL JUNIOR et al., 2006).

Alguns países que conseguiram controlar ou erradicar a LEB possuem programas oficiais baseados no imunodiagnóstico e na política de isolamento e descarte dos animais soropositivos (OIE, 2003).

A vigilância epidemiológica após a erradicação deve ser mantida, para garantir a condição de zona ou país livres de VLEB (OIE, 2003).

4 CAPÍTULO I

Leucose Enzoótica Bovina em Curraleiros Pé-Duro

Enzootic Bovine Leukosis in Curraleiro Pé-Duro

C.B. Nascimento^I, M.C. S. Batista^I, P.S.R. Mattos^{II}, A. F. Ramos^{II}, M. C.S.Fioravanti^{III},
L.Cavalcanti^{II}

RESUMO

A Leucose Enzoótica dos Bovinos (LEB) é uma enfermidade infectocontagiosa, caracterizada pelo desenvolvimento de linfossarcomas em sua evolução, invariavelmente resultando na morte do animal sendo considerada uma enfermidade de grande potencial de infecciosidade, especialmente entre bovinos produtores de leite. Levando-se em consideração a resistência parasitológica do gado CPD e a ocorrência de inúmeras doenças nos rebanhos bovinos brasileiros, objetivou-se determinar a presença do vírus da LEB em bovinos CPD. Foram utilizadas amostras de sangue de 191 animais e realizado a PCR, obtendo-se 14 (7,3%) amostras amplificadas com vírus da LEB. Verificou-se um maior índice de positividade em bovinos acima de 12 meses ($p < 0,05$). As fêmeas (7,3%) obtiveram a mesma prevalência que os machos (7,7%) ($p < 0,05$). Dentre as amostras amplificadas, apenas 2 (1%) animais positivos mostraram leucocitose, e não apresentam quaisquer sintoma da doença.

Palavras-chave: raça naturalizada, enfermidade infectocontagiosa, adaptação, *Bos taurus ibericus*.

ABSTRACT

The Enzootic Bovine Leukosis is an infectious disease characterized by the development of lymphosarcomas in its evolution, invariably resulting in the death of the animal is considered a disease of great potential infectivity, especially among dairy cattle. Then taking into account the parasitological resistance of cattle Curraleiro Pé-Duro (CPD) and the presence of

numerous diseases in brazilian cattle, this study aimed to determine the presence of the bovine leukemia virus (BLV) in CPD cattle. Blood samples were collected from 200 animals and performed PCR. Was obtained 14 (7.3%) samples amplified with the BLV. There was a higher positivity rate of cattle above 12 months ($p < 0.05$). The females (7.3%) showed the same prevalence than males (7.7%) ($p < 0.05$). Among the amplified samples, only 2 (1%) showed positive animals leukocytosis, and do not show any symptom of the disease.

Keywords: naturalized breeds, infections contagious disease, adaptation, *Bos taurus ibericus*.

INTRODUÇÃO

Os bovinos antecessores à raça Curraleiro Pé-Duro (*Bos taurus ibericus*) foram trazidos da Península Ibérica para o Brasil, no século XVI, passaram por quatro séculos em processo de seleção natural e adaptação às condições tropicais. A partir do final do século XIX, com a introdução de raças bovinas exóticas, a raça foi caracterizada como uma população vulnerável ao risco de extinção (MARIANTE; EGITO, 2002). Atualmente, existem criatórios desta raça cadastrados nos Estados do Maranhão, no Piauí, na Bahia, em Goiás e em Tocantins. Ressalta-se a rusticidade, o baixo custo de produção e a baixa exigência nutricional como qualidades indiscutíveis desses animais (NETESTADO, 1998) ademais, estudos demonstram que cordeiros de raças naturalizadas dispõem de alelos conferindo resistência a algumas doenças (WOOLLIAMS et al., 1986) além de corroborar com uma resposta imunológica mais eficiente (LOBO, 2009).

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma enfermidade infectocontagiosa de caráter crônico, causada pelo vírus da leucose bovina (VLEB) (MILLER et al., 1969). A infecção pelo VLEB induz em cerca de 30% dos animais acometidos a leucocitose com linfocitose persistente (LP) e em 0,5 a 5,0% dos bovinos infectados, com idade entre quatro a oito anos,

apresentam a forma tumoral da doença, com o desenvolvimento de linfossarcomas (PEREIRA et al., 2013).

A importância econômica relacionada à enfermidade decorre dos custos com o diagnóstico e o tratamento dos sintomas; descarte prematuro, morte de animais clinicamente afetados e condenação de carcaças (FELMER et al., 2006) além de perdas na exportação para mercados que requerem bovinos livres da infecção. Embora o risco de transmissão pelo sêmen congelado e embriões seja mínimo, o país importador pode exigir um atestado de que esse material seja oriundo de animais não reagentes, colhido, processado e armazenado em conformidade com as exigências da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Nesse caso, assume-se grande importância determinar as condições necessárias para evitar a disseminação desta doença e as restrições sanitárias relacionadas ao comércio (JULIANO et al., 2014).

Devido à intenção em expandir os núcleos de conservação e o efetivo populacional do gado Curraleiro Pé-Duro especialmente para populações de subsistência e residentes em regiões do nordeste brasileiro, além de atender às exigências para a comercialização dentro e fora do país, torna-se necessário obter dados referentes aos aspectos sanitários desses animais. Sendo assim, este estudo teve como objetivo pesquisar o VLEB em rebanhos bovinos Curraleiros Pé-Duro.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Utilizaram-se amostras de sangue total oriundas do banco de sangue da Embrapa Unidade Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF. Os sangues eram provenientes de bovinos da raça Curraleiro Pé-Duro de cinco fazendas localizadas no Estado de Goiás, com a idade variando de 3 meses a 5 anos de ambos os sexos, 13 animais machos e 178 fêmeas. As

amostras foram mantidas sob refrigeração a -20°C até o processamento para extração de DNA.

Leucograma

Realizado a contagem com o auxílio da câmara de Neubauer, efetuando-se a contagem do total dos leucócitos e a seguir, foi multiplicado por 100 e, desta forma, obtinha-se o número total de leucócitos por milímetros cúbicos de sangue seguindo metodologia realizada por MEYER (1995).

Extração e Quantificação de DNA

O DNA foi obtido diretamente de sangue total utilizando o protocolo de extração de linfócitos (SILVA, 2010). Iniciando-se com a lise das células vermelhas e em seguida adicionada a solução de lise do núcleo para a liberação do DNA e futura formação da medusa.

Para a finalização da extração o *pellet* de DNA foi eluída em TE.

O DNA foi então quantificado em géis de agarose 1% por comparação com DNA fago lambda de concentração conhecida e aplicada à tensão de 160V e 300mA em tampão 1X TBE (Tris-Borato-EDTA).

O DNA foi também quantificado através de espectrofotometria (Nanodrop ND-1000[®]) com a finalidade de verificar a qualidade e a quantidade de DNA. Após a estimativa das concentrações obtidas nas extrações, uma alíquota das amostras foram diluídas para uma concentração final de $125\text{ng}/\mu\text{L}$ para a realização da PCR para Leucose Bovina.

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Genética Animal (LGA), na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

PCR para Leucose Enzoótica Bovina (LEB)

Primers para LEB

O gene *env* foi escolhido como alvo para a PCR em razão dessa região ter importantes funções na replicação viral e na resposta imune do hospedeiro. Buscou-se a amplificação de fragmentos de 521 pares de bases através dos iniciadores: BLV1 (+) 5'-GGGCCATGGTCACATATGATTG-3'. BLV2 (-) 5'-CGTTGCCTTGAGAAACATTGAAC-3' da marca comercial IDT (integrated DNA Technologies).

Amplificação para LEB

As reações foram realizadas em um volume total de 20 µl contendo 10mM TrisHCl, 50 mM KCl, 1,5 mM de MgCL₂, 1% de DMSO, 10 pmoles de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA polimerase e 2µL do DNA de cada amostra, contendo aproximadamente 250 ng de DNA. Os ciclos padronizados para amplificação do DNA foram: uma incubação inicial a 95°C por 3 minutos, o que era seguido por 35 ciclos, cada um consistindo de desnaturação a 95°C por 60 segundos, hibridização a 59°C por 60 segundos extensão pela polimerase a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Eletroforese para LEB

Para a confirmação da reação de PCR três microlitros de cada amostra da reação de PCR juntamente com seis microlitros de azul de bromofenol foram separados em géis de agarose a 1,5% corados com brometo de etídio. Foi aplicada tensão de 160V e 300mA em tampão 1X TBE (Tris-Borato-EDTA).

Estatística e análise das sequências

Foram calculadas a frequência da infecção pelo VLEB nos diferentes estratos, para analisar a existência de diferenças significativas entre os resultados obtidos para os atributos

faixa etária e sexo. Foram utilizados para a frequência somente 191 animais, sendo 13 animais machos e 178 fêmeas uma vez que utilizando-se o para a comparação das médias foi utilizado teste Qui-quadrado (χ^2) com o auxílio do programa EPI-INFO (DEAN *et al.*, 1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PCR desenvolvida para amplificação do gene codificador da proteína gp51 mostrou-se eficiente, específica e sensível. Obteve-se uma forte banda do tamanho esperado com 521pb (Fig. 1).

A tabela 1 demonstra que de 191 amostras analisadas foi verificado que a PCR amplificou DNA proviral do VLEB em 14 bovinos (7,3%) e não houve a amplificação em 177 bovinos (92,7%).

De acordo com esses resultados, é possível classificar os rebanhos de CPD com uma baixa taxa de infecção pelo VLEB (<10%) segundo a classificação proposta por SHETTIGARA *et al.* (1986). Esses dados corroboram com os de SILVA (2001) e JULIANO *et al.* (2014) nos rebanhos curraleiro pé-duro, piauienses e goianos respectivamente.

Essa prevalência encontrada nos rebanhos de CPD é claramente inferior aos índices descritos para o gado leiteiro, estes últimos apresentam maior prevalência da enfermidade (BIRGEL *et al.*, 2006). ANDRADE (1991), MENDES *et al.* (2011) e SANTOS *et al.* (2011) relataram sendo de 35,9% ; 23,1% e 53,8% respectivamente a prevalência em rebanhos leiteiros, isto ocorre em razão da principal rota de transmissão da doença ser por via horizontal onde uma maior aglomeração de animais, característico do manejo leiteiro, desencadear maior transmissibilidade do vírus (JOHNSON; KANEENE,1992). Desde 1981, BURRIDGE *et al.* demonstraram essa característica epidemiológica da enfermidade em relação ao tipo de manejo onde, 47,8% dos animais leiteiros eram soropositivos e nos bovinos de corte somente 6,7%.

Não pode ser descartada a possibilidade da diferença encontrada nesse estudo estar igualmente associada ao tipo racial (BIRGEL JUNIOR et al.,1995), devemos considerar também que os animais Curraleiros podem ser mais resilientes a diversas doenças que os animais exóticos e possuem uma criação predominantemente extensiva e rústica, o que pode justificar um menor acometimento pela LEB. Vale ressaltar que em rebanho de Pantaneiros, apesar de ser igualmente uma raça localmente adaptada, a prevalência obtida para a presença de anticorpos da LEB foi de 22,03% (CAMARGOS et al.,2000).

No que diz respeito à prevalência em relação ao sexo, apesar de ter sido amostrado um maior número de fêmeas em relação aos machos, não foi encontrada diferença significativa entre os estratos, portanto os machos curraleiros são tão susceptíveis a infecção quanto as fêmeas curraleiras, assim como PINHEIRO JUNIOR, et al. (2013) e SILVA (2001).

Estes dados estão em desacordo com JULIANO et al (2014) e BIRGEL JÚNIOR et al. (1995), estes últimos observaram uma sororeatividade significativamente maior nas fêmeas (23,3%) que em machos (11,8%), sendo atribuído essa diferença ao maior isolamento a que são submetidos os machos, pois sejam eles reprodutores ou garrotes criados para a venda, são mantidos isolados, dificultando a transmissão horizontal do vírus portanto, a diferença pode ser atribuída a influência dos sistemas de criação ao invés do gênero sexual.

Na tabela 3 está demonstrada a prevalência por faixa etária, sendo que não houve diferença estatística significativa entre os estratos dos animais das faixas etárias, menor que 6 meses e de 7 a 12 meses e houve diferença significativa destes dois grupos em relação ao estrato de animais maiores que 12 meses ($p < 0,05$) havendo um aumento crescente na frequência dos animais positivos com o avançar da idade. Este dado corrobora com os trabalhos realizados em rebanhos nos Estados do Piauí e de Minas Gerais (SILVA, 2001; CARNEIRO, 2003) e com os resultados de JUNIOR (2003), MATOS (2005), SANTOS et al. (2011) e BAUTISTA et al. (2013) que obtiveram uma maior prevalência de bovinos soro

reagentes no grupo dos animais com idade superior a 24 meses, apresentando risco de infecção 2,7 vezes maior quando comparados aos animais com idade inferior.

OLIVEIRA et al. (1997) constataram elevação sequencial na quantidade de fêmeas holandesas dos 13 aos 18 meses (34,5%), dos 31 aos 36 meses (35,5%), dos 49 aos 54 meses (59,5%) e dos 109 aos 114 meses (66,7%).

Justificam-se estes resultados novamente de acordo com a epidemiologia da enfermidade, havendo um aumento na probabilidade de contato entre animais e/ou fômites infectados e não infectados quanto maior for a permanência do animal no rebanho, portanto interferindo positivamente na disseminação do agente com maior tempo de exposição dos animais. Inclui-se neste caso, o aparecimento de sororeatividade na faixa etária de 7-12 meses (4,2%) a partir da introdução das práticas de vacinação e vermifugação no momento da desmama natural, o que ocorre em torno de 9 e 11 meses (FLORES et al., 1988).

De acordo com MONTI et al., 2007, são determinantes na epidemiologia da doença, o fato da LEB ser uma doença crônica, com baixos índices de mortalidade, combinado ao longo tempo de permanência no rebanho e à precocidade com que os animais se infectam, o que poderia justificar o maior número amostral dos animais sororeagentes a partir dos 13 meses. Particularmente nos rebanhos de bovinos curraleiros, esses aspectos têm importância crucial na cadeia de transmissão, pois os animais permanecem no rebanho durante toda a vida, e eles possuem uma grande longevidade, sendo muito pequena a taxa de descarte e reposição de animais oriundos de outros rebanhos.

Podem ocorrer casos de maior frequência de sororeagentes em bezerros recém-nascidos e com idade até seis meses, especialmente quando o estudo é realizado através de exames indiretos. Estes testes avaliam a presença de anticorpos, podendo haver uma interferência das imunoglobulinas provindas do colostro materno, resultando em reações

falso-positivas, entretanto como a técnica de diagnóstico utilizada foi a PCR, uma técnica direta, que detecta o DNA proviral, não se observa esta situação.

Demais vantagens da reação em cadeia de polimerase, incluem que esta técnica permite a detecção precoce do antígeno nos linfócitos sanguíneos, no sétimo dia pós-infecção, antes mesmo que os bovinos desenvolvam uma resposta imunológica, ocorre também a identificação do vírus em animais com um período prolongado de incubação e em animais com baixa viremia (KAA DEN et al., 1982; JOHNSON; KANEENE, 1992).

Levando em consideração o padrão leucométrico dos CPD apresentado por PAULA NETO (2004), foi observado também neste trabalho que de maneira geral houve um número maior de animais com leucocitose em animais com idade entre 7 e 12 meses (TABELA 4) estando este dado de acordo com o estudo realizado por THEILEN et al. (1967) onde destacaram que o número total de leucócitos, bem como o número absoluto total dos linfócitos, apresentaram aumento dos seus valores nos animais sadios com idade variando entre seis e 12 meses de idade, para a seguir diminuírem, gradativamente com o desenvolvimento etário. E ao contrário do estudo feito por PAULA (2004), que observou o aumento do número de leucócitos até os seis meses de idade, com posterior declínio com o avançar da idade em animais Curraleiros. Já KATUNGUKA-RWAKISHAYA et al. (1985), destacaram não haver influência dos fatores etários no leucograma de animais com idade até cinco meses e para GARCIA-NAVARRO et al. (1994), os animais em crescimento apresentam índices linfocitários mais elevados que os adultos, pois neles a atividade imunogênica é mais intensa.

Entretanto, o estudo dos parâmetros leucométricos neste trabalho se deu pela característica patológica da enfermidade observada em um terço dos animais por causar uma resposta linfoproliferativa conhecida como leucocitose com linfocitose persistente (LP),

considerada benigna por diversos autores (WEISS; WARDROP, 2010) porém, alguns afirmam ser uma estratégia do VLEB visando a sua multiplicação (DEQUIEDT, et al.,1999) .

Apesar do estrato de 13 a 24 meses, apresentar a taxa de animais com PCR positivo para leucose mais alta, foi o grupamento de 7 – 12 meses que demonstrou uma taxa maior de leucocitose (41%).

Além disso, no estudo não foi observado a relação proposta de 30% dos animais reagentes a leucose apresentarem leucocitose, somente dois animais (1%) diagnosticados com o vírus manifestaram este sintoma, o que poderia indicar que os CPD possuem algum tipo de resiliência, indicando ser necessária uma investigação aprofundada sobre a resposta imunológica para complementar os conhecimentos acerca desta nova raça. A constatação de populações com genes de resistência para LEB pode ser fundamental para a erradicação dessa e de várias outras enfermidades.

CONCLUSÕES

A LEB foi detectada nos bovinos da raça Curraleiro Pé Duro.

A técnica de PCR pode ser utilizada para a detecção do vírus da LEB em amostras de DNA extraídas a partir de sangue total de bovinos.

Bovinos com idade entre 13 a 24 meses apresentaram maior risco de infecção e, quanto ao sexo, fêmeas e machos CPD possuem a mesma possibilidade de se infectarem pelo VLEB.

Os CPDs infectados com o VLEB apresentaram baixos índices de leucocitose.

AGRADECIMENTOS

A Embrapa Recursos Genéticos e Meio- Norte, pela disponibilidade dos laboratórios e desenvolvimento dos trabalhos.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Esse estudo foi conduzido sob os termos e condições do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí, aprovado sob o número 015/14.

REFERENCIAS

ANDRADE, J.R.A.; ALMEIDA, M.M.R. Prevalência da leucose enzoótica bovina na bacia leiteira de Goiânia, Goiás. **Hora Veterinária**. v.60, p. 49-53, 1991.

BAUTISTA, N.A. et al. Determinación serológica de leucosis bovina enzoótica en novillas de levante y vacas adultas de la vereda Morichal, Yopal, Casanare. **Ciencia y Agricultura**, v. 10, n. 1, p.31-37, 2013.

BIRGEL, J.R. et al.. Prevalência da infecção pelo vírus da Leucose dos bovinos, em animais da raça Simental, criados no estado de São Paulo. **Ars.Veterinária**, v.22, n.2, p.122-129, 2006.

BIRGEL JÚNIOR, E. H. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em animais da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. **Pesquisa Vet. Bras.**, v. 15, n. 4, p. 93-99, 1995.

BURRIDGE, M.J.; PUHR, D.M; HENNEMANN, J.M. Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida. **J.Am. Vet. Assoc.** , v. 179, n. 7, p. 704-707, 1981.

CAMARGOS, M. F. et al. Frequência de anticorpos para o vírus da leucose enzoótica bovina (LEB) em bovinos pantaneiros do núcleo de conservação a fazenda Nhumirim- Embrapa Pantanal. **In:** Simpósio Ibero Americano sobre conservação de Recursos Genéticos Animais.2000, Corumbá. **Anais**. Corumbá, p.32, 2000.

CARNEIRO, P.A.M.; et al. Prevalência da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado do Amazonas. **Acta Amazônia**, v.33, p. 111-125, 2003.

[Digite texto]

DEAN, A.G. et al. **Epi-info, version 6**: a word processing, database and statistic program for epidemiology on microcomputers. Atlanta, Georgia, Center for Disease Control, 1992. 302p.

DEQUIEDT, F. et al. Bovine leukemia virus- induced persistent lymphocytosis in cattle does not correlate with increased ex vivo survival of B lymphocytes. **Journal of Virology**, v.73, p.1127-1137, 1999.

FELMER, R.; ZUNIGA, J.; RECABAL, M. Estudio comparativo de um PCR anidado, ELISA, IDAGA en la deteccion del vírus da la leucosis bovina em muestras de leche, sangre y leche. **Arch. Med. Vet.** v.38, n.2, p.137-141, 2006.

FLORES, E.F. et al. Evolução sorológica da leucose enzoótica bovina em rebanhos do município de Santa Maria, RS. **Revista do Centro Ciências Rurais**, v.18, p.263-271, 1988.

GARCIA-NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Livraria Varela, p. 169, 1994.

JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine leukemia virus and enzootic bovine leucosis. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v.62, n.4, p.287-311, 1992.

JULIANO R. S. et al. Soroepidemiologia da leucemia bovina (LB) em bovinos Curraleiros dos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.3, 2014.

JÚNIOR LUIS, A. 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. **R. Bras. Ci. Vet.**, v. 1, n. 2, p. 93-98, 2003.

KAADEN, O.R. et al. R.Transient vitae with bovine leukemia virus in bulls. **Zentralbl. Veterinarmed.** v.29, n.40, p.269-274, 1982.

KATUNGUKA-RWAKISHAYA, E.; LARKIN, H.; KELLY, W. R. Some haematological and blood biochemical components in conventionally reared calves. **Irish Veterinary Journal**, v. 39, p. 118-123, 1985.

LOBO, J.R. **Resposta imune inespecífica e específica humoral de bezerros curraleiro e nelore vacinados com *Mycobacterium bovis* – BCG.** 2009. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2009.

MARIANTE, A.S.; EGITO, A.A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection, **Theriogenology**, Amsterdam, v.57, p.223-235, 2002.

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

MENDES, E.I. et al. Intercorrência entre leucose enzoótica bovina e tuberculose em bovinos leiteiros do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 78, n.1, p.1-8, 2011.

MEYER, D. J.; COLES, H. E.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico.** São Paulo: Roca, p. 308, 1995.

MILLER, J.M.; et al. Virus-like particles in phytohemagglutinin- stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v.43, p.1297–1305, 1969.

MONTI, G.E.; FRANKENA, K.; JONG, M.C.M. Evaluation of natural transmission of bovine leukaemia virus within dairy herds of Argentina. **Epidemiology and Infection**, v. 135, p.228-237, 2007.

NETESTADO. **Animais adaptam-se bem às regiões secas.** 1998. Acesso em: 15 julho 2015. [online]. Disponível em: <http://www.estado.estadao.com.br/agricola/htm>

OLIVEIRA, A.R. et al. Epidemiologia da leucose bovina: ocorrência de anticorpos em várias faixas etárias. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.19, n.6, p. 258-262, 1997.

- PAULA NETO, J.B. 2004. **Hemogramas de bovinos (*Bos taurus*) sadios da raça Curraleiro de diferentes idades, machos e fêmeas, gestantes e não gestantes**. Dissertação de Mestrado em Sanidade Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia. 65p
- PEREIRA, A.L.M. et al. Soroprevalência da leucose enzoótica Bovina: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 2013.
- PINHEIRO JUNIOR, J.W. et al. Epidemiologia da infecção pelo vírus da leucose enzoótica bovina (LEB). **Ciencia Animal**. v.14, p. 258 -264, 2013.
- SANTOS, H. P. et al. Frequência de anticorpos e fatores de risco associados à Leucose Enzoótica bovina em rebanhos da bacia leiteira do estado do Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 351-358, 2011.
- SHETTIGARA, P.T.; SAMAGH, B.S.; LOBINOWICH, E.M. Eradication of bovine leukemia virus infection in commercial dairy herds using the agar gel immunodiffusion test. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.50, n.2, p. 221-6, 1986.
- SILVA, D. A. et al. BoHV-1 end BoHV-5 detection in different clinical samples obtained from cattle in Goiás, Brazil by multiplex PCR. **In: XXI Encontro Nacional de Virologia e V Encontro de Virologia do Mercosul**, 2010, Gramado. Encontro Nacional de Virologia, 2009, Brasília. **Virus Reviews & Research Journal Of the Brazilian Society for Virology**, p. 126-127, 2010.
- SILVA, S. V. D. **Leucose Enzoótica Bovina - Prevalência de anticorpos sérios antivírus da Leucose dos Bovinos em rebanhos cruzados - holandês/zebu e em animais da raça Pé duro, criados no Estado do Piauí**. 2001. 176p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- STRAUB, O.C. Horizontal transmission studies on enzootic bovine leukosis. **Ann. Rech. Vet.**, v. 9, n. 4, p. 809-813, 1978.

THEILEN, G. H. et al. Hematologic survey of cattle on the Island of Jersey with refence to the reported incidence of limphosarcoma (Leukemia). **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.28, p. 1313-1318, 1967.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm`s Veterinary Hematology**. Wiley Blackwell, Ames, p.1232, 2010.

WOOLLIAMS, J.A. et al.. Studies on lambs from lines genetically selected for low and high copper status. 2. Incidence of hypocuprosis on improved hill pasture. **Animal Production**, v.43, p.303-317, 1986.

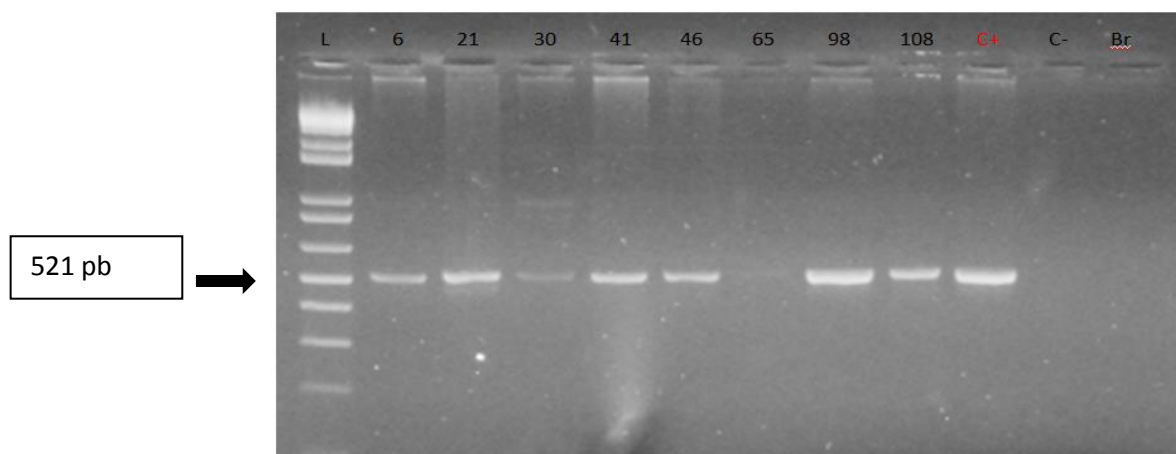


Fig. 1 – Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para os produtos de PCR para o diagnóstico de LEB das amostras. Canaleta 1 - padrão Leader. Canaletas 2 a 9- amostras. Canaletas 10 a 12- Controle positivo, controle negativo e branco.

Tab. 1 - Resultados obtidos em amostras sanguíneas pela técnica de PCR.

	Amplificação	%	Não amplificação	%	Total
PCR	14	7,3	177	92,7	191

Tab. 2 - Resultados do diagnóstico para LEB em amostras de sangue de CPD de acordo com o sexo.

	Amplificado	%	Não amplificado	%
Macho	1	7,7 ^a	12	92,3 ^a
Fêmea	13	7,3 ^a	165	92,7 ^a

^aLetras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (χ^2 ; $p < 0,05$) entre os sexos

Tab. 3 - Resultados do diagnóstico para LEB em amostras de sangue de CPD de acordo com a idade.

Idade	Reagente	Total de amostras
< 6 meses	0 (0%) ^a	01
7-12 meses	01(4,2%) ^a	24
13- 24 meses	13(7,8%) ^b	166

^aLetras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (χ^2 ; $p < 0,05$) entre as idades.

Tab. 4 - Quantidade de animais com leucocitose em amostras de sangue de CPD de acordo com a idade

Idade	Leucocitose	%	PCR +
< 6 meses	0	0	0
7-12 meses	10	41 ^a	01
13-24 meses	23	18,5 ^b	13

^aLetras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (χ^2 ; $p < 0,05$) entre as idades

[Digite texto]

5 CAPÍTULO II

Sequenciamento do gene *env* do vírus da Leucose Enzoótica Bovina em Curraleiros Pé-Duro

Caliandra Bona Nascimento¹, Maria do Carmo S. Batista¹, Paulo Sérgio R. Mattos², Lilian Cavalcanti², Naiara Milagres Augusto da Silva², Gleison Ricardo de Biazio², Maria do Socorro Maués Albuquerque², Alexandre Floriani Ramos²

ABSTRACT.- Nascimento C. B., Batista M.do C.S., Mattos P.S.R., Cavalcanti L., Silva N.M.A. & Biazio G.R. 2015. [Sequencing of *env* gene of enzootic bovine leukemia virus in Curraleiros Pé-Duro] Sequenciamento do gene *env* do vírus da leucose enzoótica bovina em Curraleiros Pé-Duro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(00):00-00. Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Pós-graduação em Ciência Animal, Campus Universitário Min. Petronio Portella, Av. Universitária s/n, Bairro Ininga, CEP 64.049-450, Teresina, PI, Brasil. E-mail: caliandra_bona@hotmail.com; The Enzootic Bovine Leukosis (EBL) is one agent oncovirus, Retroviridae family member. The identification of the virus and with it the development of serological techniques allowed the recognition of the importance of this disease and its economic impact on cattle herds. Due to the absence of effective treatment and vaccine research It enhance the study of early and sensitive diagnostic testing and control programs and prevention of disease. In this study, four whole blood samples of positive Foot-Hard Curraleiro breed cattle for LEB, were subjected to polymerase chain reaction (PCR) employing the BLV1 and BLV2 primers used for the amplification and detection part of the gene Envelope (*env*) virus being then carried out the sequencing thereof. Comparisons alignments and phylogenetic analysis of the sequences of the *env* gene lines obtained with sequences from GenBank were performed to determine their similarities. It has been shown that the infecting virus in the herd studied Curraleiro cattle are more related to strains in the US and Australia. This study allowed us to analyze the sequences of the *env* gene nucleotide of enzootic bovine leukemia virus in native cattle, which are useful results to improve diagnostics and increase the effects of programs for future eradication and distribution VLEB animals locally adapted from Brazil.

INDEX TERMS: Oncovirus, VLEB, PCR, adapted breeds.

RESUMO.- A Leucose Enzoótica Bovina (LEB) tem como agente um oncovírus, membro da família Retroviridae. A identificação do vírus e com ele o desenvolvimento de técnicas sorológicas permitiram o reconhecimento da importância desta enfermidade e seu impacto econômico nos rebanhos bovinos. Devido à ausência de um tratamento e vacinas eficazes, as pesquisas intensificam-se no estudo de testes de diagnóstico mais sensíveis e precoces e de programas de controle e prevenção à doença. Neste estudo, 4 amostras de sangue total de bovinos da raça Curraleiro Pé-Duro positivos para LEB, foram inicialmente submetidos à reação em cadeia de polimerase (PCR) empregando os iniciadores BLV1 e BLV2, utilizados para a amplificação e detecção de parte do gene do envelope (*env*) do vírus sendo em seguida realizado o sequenciamento do mesmo. Comparações de alinhamentos e a análise filogenética entre as sequências do gene *env* das linhagens obtidas com sequências do GenBank foram realizadas para determinar suas similaridades. Foi demonstrado que o vírus infectante de bovinos Curraleiros estudados estão mais relacionadas com linhagens dos EUA e Austrália. Este estudo permitiu analisar as sequências de nucleotídeos do gene *env* do vírus da leucose enzoótica bovina em bovinos nativos, sendo estes resultados úteis para aprimorar os métodos de diagnóstico e aumentar os efeitos de programas que visam a futura erradicação e distribuição do VLEB nos animais localmente adaptados do Brasil.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Oncovirus, VLEB, filogenia, raças brasileiras.

Recebido em

Aceito para publicação em

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Av. Universitária s/n, Teresina, PI 64049-550, Brasil. *Autor para correspondência: caliandra_bona@hotmail.com¹.

² Laboratório de Genética Animal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Embrapa Recursos Genéticos, Brasília, DF, Brasil.

[Digite texto]

INTRODUÇÃO

A leucose enzoótica bovina (LEB) é uma enfermidade linfoproliferativa cuja patologia é causada por um retrovírus denominado vírus da leucose enzoótica bovina (VLEB) que se apresenta em formato esférico com diâmetro de 80 a 130 nm. Em seu interior possui duas moléculas de RNA de cadeia simples, estabilizados mediante interação com uma nucleoproteína p12, este complexo é rodeado pelo capsídeo que apresenta simetria icosaédrica e este sendo envolvido pelo envelope, formado com projeções de glicoproteínas transmembranárias e de superfície, as duas são codificadas pelo gene *env*, gp 30 e gp 51 respectivamente (Luders, 2001). Esta última é a glicoproteína imunodominante e mais precocemente detectada pelos anticorpos, sendo bastante visada em testes de diagnóstico para a enfermidade (Mamoun et al.1990).

Nos testes sorológicos, a quantidade de anticorpos presentes no sangue pode ser influenciada pela variação no provírus (Fechner et al., 1997) podendo explicar falhas na detecção dos animais acometidos e aumentar a prevalência de animais falsos negativos portanto, a descoberta de novas estirpes pode aperfeiçoar as técnicas de diagnóstico. A erradicação completa dos retrovírus só será possível quando forem obtidas informações sobre a variabilidade viral em rebanhos infectados e em animais individuais (Pisoni et al., 2005).

Torna-se então, a aplicação da análise filogenética para as sequências do VLEB crucial para estudar possíveis diferenças na virulência entre estirpes dos vírus circulantes.

Adicionado a este fato, atualmente a maioria dos kits de diagnóstico para LEB são importados e o produto caro. Devido ao grande contingente do rebanho brasileiro e a ausência de insumos para o diagnóstico no mercado interno, a realização de testes laboratoriais para a identificação dos animais infectados torna-se economicamente dispendioso e é evidenciado como um ponto de estrangulamento no diagnóstico. Estes são os principais fatores que inibem as iniciativas de implementação de programas de controle da doença. Evidencia-se, portanto a necessidade no mercado nacional da disponibilidade de mais kits para o diagnóstico da LEB a um custo acessível e que permitam exames de alta especificidade (Troiano, 2009).

Os bovinos CPD, cujos ascendentes foram trazidos na época do descobrimento do Brasil, sofreram uma adaptação natural durante cinco séculos e permaneceram marginalizados durante alguns anos pelos agropecuários. Com características singulares de vida e manejo já foram diagnosticados portadores do VLEB, entretanto parecem apresentar certa resiliência em relação ao vírus desta enfermidade, como correspondem a animais diferenciados com uma rica diversidade genética e com altos índices de rusticidade espera-se que o vírus possa ter alguma mutação para poder infectar estes animais nativos, neste caso, podemos nos basear com a menor susceptibilidade dos búfalos à infecção pelo VLB em relação aos bovinos (Rajão et al.,2010).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo analisar a sequência de nucleotídeos do gene *env* do vírus da leucose enzoótica bovina em CPD como embasamento para futuros estudos sobre a epidemiologia molecular da LEB em rebanhos de animais brasileiros com especial interesse em aprimorar os métodos de diagnóstico e aumentar os efeitos de programas para a futura erradicação e distribuição do VLEB.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras. Utilizaram-se oito amostras de sangue total oriundo do banco de sangue da Embrapa Unidade Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF. Os sangues eram provenientes de bovinos da raça Curraleiro Pé-Duro de cinco fazendas localizadas no Estado de Goiás, seis animais fêmeas e dois machos com idade de 24 meses.

Extração e Quantificação de DNA. O DNA foi obtido diretamente de sangue total utilizando o protocolo de extração de DNA em linfócitos (Silva, 2010). Iniciando-se com a lise das células vermelhas e em seguida adicionada a solução de lise do núcleo para a liberação do DNA e futura formação da medusa. Para a finalização da extração o pellet de DNA foi eluído em TE. O DNA foi então quantificado em géis de agarose 1% por comparação com DNA fago lambda de concentração conhecida e aplicada à tensão de 160V e 300mA em tampão 1X TBE (Tris-Borato-EDTA).

O DNA foi também quantificado através de espectrofotometria (Nanodrop ND-1000®) com a finalidade de verificar a qualidade e a quantidade de DNA. Após a estimativa das concentrações obtidas nas extrações, uma alíquota das amostras foram diluídas para uma concentração final de 125ng/μL para a realização da PCR para Leucose Bovina.

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Genética Animal (LGA), na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

PCR para Leucose Enzoótica Bovina (LEB)- Primers para LEB. Buscou-se a amplificação de fragmentos de 521 pares de bases através dos iniciadores: BLV1 (+) 5'- GGGCCATGGTCACATATGATTG-3' e BLV2 (-) 5'- CGTTGCCTTGAGAAACATTGAAC-3' da marca comercial IDT (integrated DNA Technologies). Os ciclos padronizados para amplificação do DNA foram: uma incubação inicial a 95°C por 3 minutos, o que era seguido por 35 ciclos, cada um consistindo de desnaturação a 95°C por 60 segundos, hibridização a 59°C por 60 segundos extensão pela polimerase a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

Eletroforese para LEB. Para a confirmação da reação de PCR três microlitros de cada amostra da reação de PCR juntamente com seis microlitros de azul de bromofenol foram separados em géis de agarose a 1,5% corados com brometo de etídio. Foi aplicada tensão de 160V e 300mA em tampão 1X TBE (Tris-Borato-EDTA).

Purificação e sequenciamento genético do vírus da Leucose Bovina. Após a visualização em géis, os fragmentos da PCR foram então purificados segundo o protocolo Exo-SAP (versão 3 Applied Biosystems) com um mix contendo 0,5U da enzima Exonuclease I (EXO1) e 0,5U da enzima Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP). A função da EXO é a de degradar o excesso de iniciadores que sobraram na reação da PCR, enquanto que a SAP desfosforila os dNTPs não incorporados na reação. Juntamente com 5uL do PCR de cada amostra foram colocados 0,2 uL de EXOSAP e 1,8uL de água mili-Q autoclavada para cada amostra e submetidos ao termociclador a temperatura de 37°C por 30 minutos e posteriormente 80°C por 20 minutos para inativação das enzimas.

Uma vez purificados, os fragmentos de DNA submetidos à reação de sequenciamento, que foi realizada segundo o método de Sanger-Coulson utilizando 1,75 uL do tampão 5X (BigDye v.3- Applied Biosystems), 0,5 uL de BigDye v.3 Applied Biosystems, 1,5 uL do produto de PCR purificado, 2 uL dos primers BLV1 e BLV2 separadamente e 4,25 uL de água mili-Q autoclavada para completar o volume final de 10uL. Sendo esta realizada em placas de 96 poços. O programa da reação de sequenciamento utilizado no termociclador é composto por 96°C por 1 minuto, 25 ciclos com 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após a realização da reação de sequenciamento as placas foram purificadas adicionado 3,0 uL de EDTA (125mM) e 25 uL de etanol absoluto. Imediatamente após as placas foram invertidas e submetidas a uma rápida centrifugação até a velocidade de 1000rpm com o objetivo de remover o etanol e EDTA. Logo em seguida, foram adicionadas em capa poço 30 uL de etanol 70% e as placas foram submetidas novamente a centrifugação na mesma velocidade por 15 minutos. Neste momento as placas foram secas à temperatura ambiente até que o excesso de etanol evaporasse.

Para a finalização do procedimento, foram adicionados 10 uL de formamida Hi-Di em cada poço da placa e levada ao termociclador para desnaturação a 95°C por 5 minutos. Decorrido este tempo a placa foi imediatamente colocada em gelo para resfriamento e submetidas ao sequenciador (ABI Prism 3100 Genetic Analyzer® - Applied Biosystems).

Análise das sequências. Os dados obtidos no sequenciamento foram analisados e editados utilizando o SeqScape software v2.5 (Life Technologies, USA) sendo a sequência referência retirada do Genbank com o número de acesso AF399702. Para a determinação de similaridade em relação aos nucleotídeos, utilizou-se o Basic Local Alignment Search Tool (BlastN) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

A inferência filogenética foi realizada mediante uso do programa Mega versão 6 (Tamura et al., 2013). A árvore gerada a partir da sequência nucleotídica foi construída com o método de neighbor-joining através do modelo de substituição maximum composite likelihood para a região parcial do gene *env* glicoproteína 51 do VLEB as comparações foram realizadas com cepas adicionadas no *Genbak* dos Eua, Austrália, Argentina, Polônia e Alemanha.

Ética e experimentação animal. Esse estudo foi conduzido sob os termos e condições do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Piauí, aprovado sob o número 015/2014.

RESULTADOS

A reação em cadeia da polimerase (PCR) realizada para a amplificação parcial do gene *env* mostrou-se eficiente, obtendo-se uma forte banda do tamanho esperado com 521pb atendendo ao objetivo básico de gerar produtos para o sequenciamento do gene *env* (Fig. 1), das oito amostras sequenciadas foram escolhidas as quatro possíveis para a realização das análises.

As amostras sequenciais obtidas foram nomeadas de PD_BLV, representando abreviaturas para Pé-Duro e Bovine Leukemia Virus respectivamente, os números presentes representam a identificação de cada animal.

A análise dos sequenciamentos das quatro amostras realizadas no *BlastN* mostraram que os fragmentos amplificados demonstraram grande similaridade com a referência brasileira numero de acesso AF399709 como pode ser observado no quadro 1 e com outras amostras presentes no *Genbank*.

Nas sequencias PD_BLV 10 e 41 houveram 11 e 12 substituições de nucleotídeos respectivamente, nas amostras PD_BLV 82 e 98 houveram 8 substituições de nucleotídeos (Fig.2). Apesar dessas substituições diagnostica-se o gene como tendo pequeno índice de variações genéticas.

A análise filogenética referente às sequências parciais do gene *env* (gp51) detectados no presente estudo, juntamente com sequências de demais países retirados do *GenBank* revelou que os vírus sequenciados nos Curraleiros formam um aglomerado de sequências idênticas e altamente relacionados entre si (Fig.3) e podem ser inclusas no grupo de cepas americanas e australianas. Ademais, sugere-se a formação de um agrupamento Austrália-Eua, um agrupamento Brasileiro, um agrupamento Argentina-Brasil, e um agrupamento Polônia-Brasil e Alemanha.

DISCUSSÃO

Dos oito produtos de amplificação pela PCR, foi possível obter apenas quatro sequências que foram utilizadas para a realização da análise filogenéticas. Podemos atribuir esta perda a fatores relacionados principalmente à quantidade de DNA presente na amostra e à purificação insatisfatória dos produtos submetidos à reação de sequenciamento.

No ano 2001 foram submetidas as primeiras sequencias do vírus da LEB brasileiras no Genbank (Camargo,2001) com estes resultados pode-se submeter as primeiras em bovinos CPDs.

Mansky e Temin (1994) relataram alta taxa de mutação nos retrovírus, associando este fato à transcriptase reversa em virtude do alto número de ciclos de replicação, mas no presente trabalho ficou evidenciado, que há uma conservação das sequências de nucleotídeos. De acordo com o BlastN as amostras entre si obtiveram similaridade de identidade de 97 a 99%, e entre a amostra referencia de 95 a 97%, corroborando com Camargo (2001) que encontrou uma similaridade de 96 a 98% com sua sequencia de amostra referência japonesa. Entre as sequencias de outros países obteve-se uma similaridade de 96 a 97%. Em outro estudo foi encontrado uma similaridade da amostra argentina com as amostras da Austrália, Bélgica e Japão com 95,1%, 95,6% e 95,9% respectivamente (Dube et al.2000). De acordo com Felmer et al. (2005) o VLEB pode conservar suas características genéticas em diferentes áreas geográficas por longos períodos.

Apesar da pequena variação genética encontrada no gene *env* do BLV é possível que pequenas variações no provírus causem falhas no anelamento, o que pode causar mutações e falhas em testes de diagnóstico (Mamoun et al., 1990, Camargos, 2001).

De acordo com a árvore filogenética obtida, os resultados foram condizentes com Camargos (2001) por serem igualmente enquadrados perto do grupo de cepas americanas e australianas (Fig 3). Segundo Johnson & Kaneene (1992) a disseminação da infecção nos rebanhos americanos, contribuiu para a propagação do vírus em outros países na America do Sul, o que poderia justificar também o agrupamento Argentina-Brasil.

A análise filogenética evidenciou também uma relação estreita entre a referência brasileira utilizada e amostras europeias da Polônia e Alemanha, podendo-se confirmar a informação que indica a origem dos vírus atualmente existentes por cepas europeias, de acordo com o primeiro relato na literatura alemã em 1871 (Mamoun, 1990).

As novas variantes dos vírus podem aprimorar o diagnóstico em saúde animal, com a produção de testes com custos mais baixos e de simples metodologias, com a facilidade na realização em grande número de amostras, além de mais específicos e sensíveis para as variantes brasileiras existentes nos rebanhos nativos, auxiliando o estabelecimento de programas de erradicação de acordo com a distribuição das linhagens do VLEB e na definição de bases para o desenvolvimento de reagentes para o diagnóstico promovendo, maior controle da enfermidade no Brasil.

Neste contexto, o ideal seria a realização de mais estudos avaliando a variação genética no gene *env* paralelamente à avaliação contínua dos animais e a colheita de células sanguíneas a partir de demais tipos de amostras, como órgãos afetados pelo vírus, portanto estes resultados indicam que mais estudos devem ser realizados com o diversificado genoma de bovinos nativos do Brasil e com outros vírus de importância agropecuária.

CONCLUSÕES

[Digite texto]

As regiões sequenciadas do gene *env* do vírus da LEB apresentam um alto grau de conservação. Novas variantes do vírus da Leb foram descobertas em CPD.

Estas novas variantes podem ser relevantes para o desenvolvimento de testes de diagnósticos sensíveis às raças brasileiras.

Agradecimentos.- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Recursos Genéticos, e a CAPES.

REFERENCIAS

- Camargos, M.F.; Padronização de uma PCR para o diagnóstico da leucose enzoótica bovina e sequenciamento parcial do gene *env*. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte UFMG- Escola de Veterinária, 2001, p. 38.
- Dube, S.; Dolcini, G.; Abbott, L.; Mehta, S.; Dube D.; Gutierrez S.; Ceriani C.; Esteban, E. The Complete Genomic Sequence of a BLV Strain from a Holstein Cow from Argentina. 2000. **Virology** 277: 379±386.
- Fechner H.; Blankenstein, P.; & Looman, A. C. et al. 1997. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. **Virology**, 237: 261-269
- Felmer, R.; Munoz, G.; Zuniga, J.; Recabal, M. Molecular analysis of a 444 bp fragment of the bovine leukaemia virus gp51 *env* gene reveals a high frequency of non-silent point mutations and suggests the presence of two subgroups of BLV in Chile. 2005. **Veterinary Microbiology**, v. 108, p. 39-47.
- Johnson R., Kaneene J. B. Bovine Leukaemia Virus and Enzootic Bovine Leukosis. 1992. **Veterinary Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 287-312.
- Luders, M. A.; Prevalência de Anticorpos contra o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina em fêmeas com mais de dois anos no Rebanho de Bovinos Leiteiros no Município de Mafra- SC; LAGES(SC). 2001. 31 f. Especialização em Sanidade Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2001.
- Mamoun R. Z., Morisson M., Rebeyrotte N., Busetta B, Couez D, Kettmann R., Hospital M. & Buillemain B. 1990. Sequence variability of bovine leukemia virus *env* gene and its relevance to the structure and antigenicity of the Glycoproteins. **Journal of Virology**. 64: 4180-4188.
- Mansky, L. M.; Temin, H. M. 1994. Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. **Journal of Virology**, 68: 494-499.
- Pisoni, G., Quasso, A., Moroni, P., 2005. Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: Evidence for natural transmission from goats to sheep. **Virology** 339: 147–152.
- Rajão D.S., Bastianetto E., Reis J.K.P, Oliveira, D.A.A., Lago L. A., Leite R.C. 2010. Estudo da infecção pelo vírus da leucose bovina em bubalinos (*Bubalus Bubalis*) no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 32:42-45.
- Silva D. A., Silva, A. M., Souza, K. M., Soares, P. ; Castro, M.C. ; Moraes, P.C.G. ; Roehe, P. M. ; Brito, W. M. E. D. BoHV-1 end BoHV-5 detection in different clinical samples obtained from cattle in Goiás, Brazil by multiplex PCR. **In: XXI Encontro Nacional de Virologia e V Encontro de Virologia do Mercosul, 2010, Gramado. Encontro Nacional de Virologia, 2009, Brasília. Virus Reviews & Research Journal Of the Brazilian Society for Virology**, p. 126-127, 2010.
- Tamura K, Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** 30: 2725-2729.
- Troiano L. D. C. 2009. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais anti-gp51 do vírus leucose bovina (VLB). Dissertação (Mestrado em Biologia) Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, p.101.
- Willems L., Kettmann R., Dequiedt F., Portetelle D., Voneche V., Cornil I., Kerkhofs P., Burny A. & Mammerickx M. *In vivo* infection of sheep by bovine leukemia virus mutants. 1993. **Journal of Virology**, 67: 4078-4085.

Legenda das Figuras

Fig. 1. Eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo para os produtos de PCR para o diagnóstico de LEB das amostras. Canaleta 1 - padrão Leader. Canaletas 2 a 9- amostras. Canaletas 10 a 12- Controle positivo, controle negativo e branco.

[Digite texto]

Fig. 2. Resultado do MegaBlast das amostras sequenciadas.

Fig. 3. Árvore filogenética desenvolvida através do método de neighbor-joining com o modelo de substituição maximum composite likelihood (Software Mega v. 6). As amostras apresentam o número de acesso/país do estudo. Os números próximos a cada nó representam os valores de 100 repetições de os valores de *bootstrap* (100 repetições) e a escala representa o número de substituições/sítio.

Tabela 1. Identidade das seqüências de nucleotídeos do gene *env* de isolados brasileiros com a referência brasileira (BlastN, Genbank).

	Isolado	Max score	e-value	Max Ident
1	PD_BLV_10	774	0.0	95%
2	PD_BLV_41	780	0.0	95%
3	PD_BLV_82	699	0.0	96%
4	PD_BLV_98	795	0.0	96%

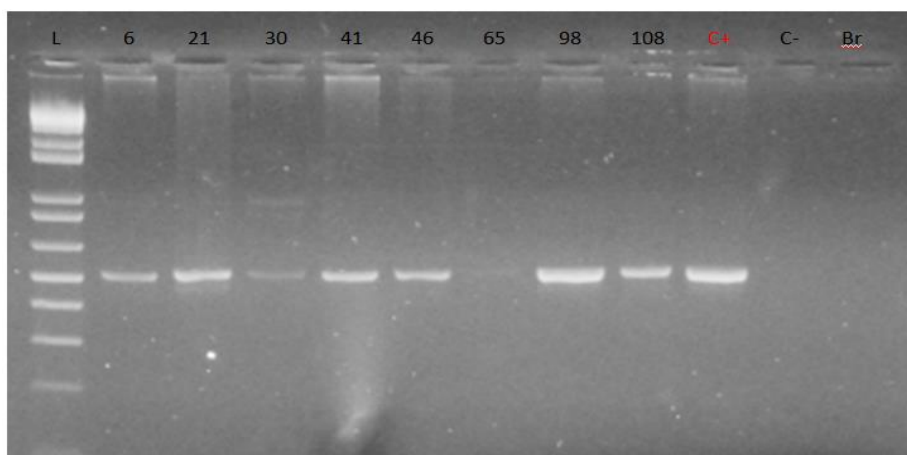


Figura 1

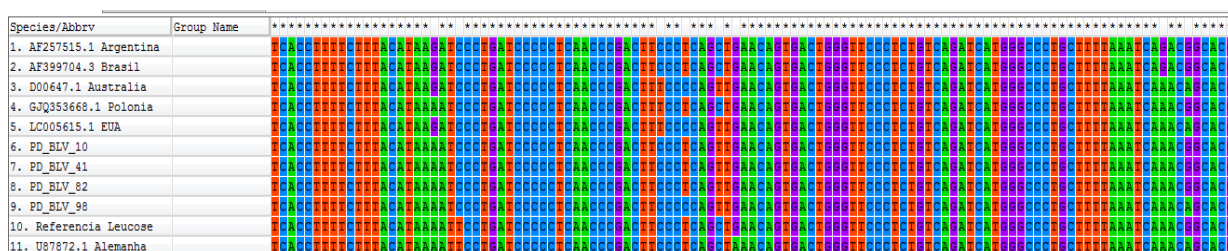
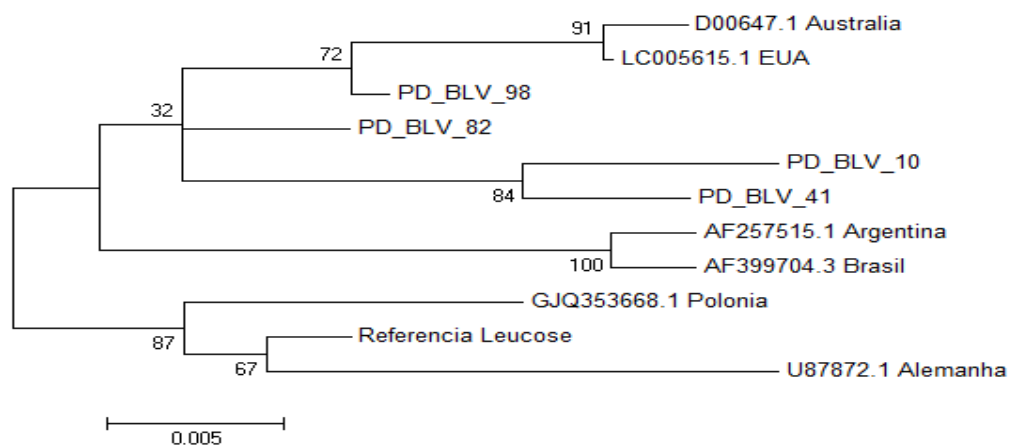


Figura 2



[Digite texto]

Figura 3

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o desenvolvimento deste trabalho foram obtidos resultados até então desconhecidos, através da realização e análise filogenética do sequenciamento do VLEB em CPDs, permitindo um maior discernimento do tipo de vírus da LEB que infecta estes animais, na sua origem e capacidade de mutação.

Estes resultados poderão ser empregados como base em outros estudos para o descobrimento de novas estirpes do VLEB, no intuito de esclarecer a origem da introdução deste vírus em rebanhos que naturalmente não o possuem. Este seria o primeiro passo para a concretização da diminuição da prevalência e futura erradicação da LEB no Brasil, estabelecendo programas de acordo com a distribuição das linhagens de VLEB, além de fundamentar o desenvolvimento de reagentes para diagnóstico de maior especificidade e sensibilidade do que os atualmente disponíveis no mercado para os rebanhos brasileiros.

É salutar que a aplicação da análise filogenética para as seqüências de VLEB tem um valor substancial para o estudo epidemiológico da infecção, auxiliando na descoberta das diferenças na virulência entre linhagens de VLEB circulantes, auxiliando a compreensão das propriedades genéticas, antigênicas, patogênicas e epidemiológicas, sendo possível desencadear estudos para o desenvolvimento de antígenos vacinais e de diagnóstico.

Portanto, estudos similares e complementares devem ser conduzidos tanto com outros fragmentos deste vírus, como com outros vírus de importância na agropecuária brasileira e com outras raças nativas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

ABREU, C. **Capítulos de História Colonial & Caminhos Antigos e Povoamento do Brasil**. Brasília. Ed. UNB, 1982.

ADAMS, L.G.; TEMPLETON, J.W. Genetic resistance to bacterial diseases of animals. **Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties**, Paris, v.17, n.1, p.200-219, 1998.

ALMEIDA, G.M. Caracterização genética dos bovinos da raça pé-duro utilizando marcadores moleculares ancorados / Glícia Maria de Almeida. – Teresina, 2008.92 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias.2008.

ALTANER, C.; BAN, J.; ZAJAC, V.; ROESSLER, H.; ROSENTHAL, S.; KETTMANN, R.; BURNY, A. Isolation and characterization of cell clones producing various amounts of bovine leukemia virus. **Folia Biology**, v.31, p.107-114, 1985.

ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, n 99, p.223-243, 2007.

ANDRADE, Manuel Correia de. **A terra e o Homem nenhum Nordeste** .3.ed. São Paulo: Brasiliense, 1973. 252 p. (Série Principios).

ANTONIL, Cultura e Opulência por suas Drogas e Minas – edição fac-similar da edição Princeps de 1711. Recife, **Imprensa** Universitária da EFPE, 1969, p.184 – 186. 1711.

ATHANASSOF, N. **Manual do criador de bovinos**. Ed. Melhoramentos, 6ª ed., p. 818, 1957.

BAN, J.; GIECIOVA, E.; ORLIK, O.; ALTANER, C. Use of monoclonal antibodies in an ELISA for the diagnosis of bovine keukaemia virus infection. **Journal of virological methods**, v.30, n.1, p.79-87, 1990.

BARROS, C.S.L.; FLORES, E.F. Leucosis bovina. In: XVII Jornadas Uruguayas de Buiatria. Paysandú, R.O.U. **Anais...** p. 01-20. 2007.

BAUMGARTNER, L.E.; OLSON, C. Survey for antibodies to leukemia (C-type) virus in cattle. **J. Vet. Med. Assoc.** v. 166, n. 3, p. 249-251, 1975.

BEJA-PEREIRA, A.; ALEXANDRINO, P.; BESSA, I.; CARRETERO, Y.; DUNNER, S.; FERRAND, N.; JORDANA, J.; LALOE, D.; MOAZAMI-GOUDARZI K; SANCHEZ, A.; CANON, J. Genetic characterization of southwern European bovine breeds: A historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. **J. Hered.** 94. 3 p. 243-250. 2003.

BIANCHINI, E. Avaliação de alguns fatores físicos na adaptação ao calor em cinco raças de bovinos naturalizadas brasileiras e duas de exploração comercial. 2005. 52 f. **Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)**- Pós Graduação em Ciência Animal. Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2005.

BIANCHINI, E. ; MCMANUS, C.; LUCCI, C. M.; FERNANDES, M.C.B.F.; PRESCOTT, E.; MARIANTE, A.DA S.; EGITO A.A.DO. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.41, n.9, p.1443-1448, set. 2006.

BIRGEL, E.H. Leucose linfática enzoótica dos bovinos adultos: aspectos clínicos e diagnósticos. 1982. **IN:** Sociedade Paulista de Medicina Veterinária. Patologia clínica veterinária. São Paulo, 1982.

BIRGEL JR, E.H. **Hemograma de bovinos (*Bos Taurus*, Linnaeus, 1758), da raça Jersey, criados no Estado de São Paulo. Influência de fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose bovina.** 1991. 267 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bovina) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

BIRGEL JR, E.H et al. Valores de referência do leucograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Scie.**, São Paulo, v.38,n.3, p.136-141, 2001.

BIRGEL, JR, E.H.; DIAS, W.M.C; SOUZA, R.M; POGLIANI, F.C; BIRGEL, D.B; BIRGEL, E.H. Prevalência da infecção pelo vírus da Leucose dos bovinos, em animais da raça Simental, criados no estado de São Paulo. **Ars.Veterinária.** v. 22 n. 2,122-129, 2006.

BLOOD, D.C.; RADOSTITS, O.M. **Clínica Veterinária.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. cap. 21: Doenças causadas por vírus e clamídias-I: p. 684-691,1991.

BORTOLOZZI, J.; HINES, H. C. Antigenos linfocitarios e resistencia ao vírus da leucose bovina. **Pesq. agropec. bras**, Brasilia, 20(2): 235-239, fev. 1985.

BRAGA, F. M.; VAN DER LAAN, C. W.; SCHUCH, L.F.; HALFEN, D.C. Infecção pelo vírus da Leucose Enzoótica Bovina (BLV) **Cienc. Rural** vol.28 no.1 Santa Maria Jan./Mar. 1998.

BRITTO, C. M. C. **Citogenética do gado Pé-Duro**. Teresina: EDUFPI, 94, p. 1998.

BRITTO, C. M. C; Mello, M. L. S. Morphological Dimorphism in the Y Chromosome of "Pé-Duro" Cattle in the Brazilian State of Piauí. **Genetics and Molecular Biology**, 22, 3, 369-373. 1999.

BRUNEL, E.M.; MENDONÇA, N.Y.B.; COLMAN, O.L.R.; BULMAN, G.M. Leukosis enzoótica bovina. Tasa de prevalência en la provincial de Formosa (República Argentina) mediante la prueba de imunodifusion en gel de agar com antígenoglicoprotéico. **Revista de Medicina Veterinária**, v.62, n.6, p.486-490, 1981.

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.

BUEHRING, G.C.; KRAMME, P.M; SCHULTZ, R.D. Evidence for bovine leukemia virus in mammary epithelial cells of infected cows. **Laboratory Investigation**, v.71, n.3, p.359-65, 1994.

BUEHRING, G.C.; PHILPOTT, S.M.; CHOI, K.Y. Humans have antibodies reactive with Bovine leukemia virus. **AIDS. Res. Hum. Retroviruses**. v.19, n 12, p.1105-113, 2003.

BURNY, A.; BEX, F.; CHANTRENNE, H. Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis. **Advances in Cancer Research**, v. 28, p. 251 -311, 1978.

CAMARGOS, M.F.; JÚNIOR, A.C.DE O.; CRUZ, J.C.M.; LESSA L.M.; ROCHA, M.A.; STANCEK D.; PELLEGRIN, A.O.; REIS, J. K.P.; LEITE,R.C. Testes de diagnóstico para o vírus da Leucemia bovina. **R. Bras. Ci. Vet.**, v. 12, n. 1/3, p. 149-150, jan./dez. 2005.

CAMARGOS, M.F.; FELIZIANI, F.; DE GIUSEPPE, A.; LESSA, L.M.; REIS, J.K.P; LEITE, R.C. Evaluation of diagnostic test to bovine leucemia vírus. **Revista Portuguesa de Ciencias Veterinaria**. v.102, p. 169-173, 2007.

CARDOSO, C. C. **Tolerância ao calor em bovinos das raças Curraleira Pé Duro, Pantaneira e Nelore utilizando imagens termográficas**. Brasília, 2013. 38 f. Monografia – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

CARNEIRO, P. A. M. **Leucose enzoótica dos bovinos**: prevalência de anticorpos séricos anti-vírus da leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados na microrregião de Manaus, Estado do Amazonas. 2000.107 f. Dissertação (mestrado em Clínica Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

CARNEIRO, P. A. M. et al. Prevalência da infecção pelo vírus da Leucose dos bovinos em rebanhos leiteiros criados no Estado do Amazonas, Brasil; **Acta Amazonica**. v. 33, n. 1, p. 111-125. 2003.

CARVALHO, G. M. C. Caracterização fenotípica do gado Pé-Duro do Nordeste do Brasil /... [et al.]. - Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2010. 24 p.; 21 cm. - (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa MeioNorte**).

CARVALHO, G. M. C.; AZEVEDO, D.M.M.R.; LIMA NETO, A.F.; NASCIMENTO, H.T.S.; FROTA, M.N.L.; NETO, R.B.; BLACKBURN, H.D. Uso de touros Curraleiro Pé-Duro em vacas Nelore para produção de carne no Nordeste do Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49. 2012, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2012. p(CD-ROM).

CARVALHO, G.M.C. **Autêntico nordestino, gado Pé-Duro é tido como valioso patrimônio genético.** Teresina, 2013. (entrevista à TV Cidade Verde)^a

CARVALHO, G. M. C.; FÉ DA SILVA, L. R.; ALMEIDA, M. J. O. ; LIMA NETO, A.F.; BEFFA, M. L. Avaliações fenotípicas da raça Curraleiro Pé-Duro do Semiárido do Brasil. **Arch. Zootec.**, v. 61, n. 237, p. 2-12. 2013^b.

CARVALHO, J. H. de. Pé-duro, patrimônio preservado no Piauí. **Dirigente Rural**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 26-28, 1985.

CARVALHO, J. H. C.; GIRÃO, R. N. Conservação de recursos genéticos animais: a situação do bovino Pé-duro ou Curraleiro. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC 2. Anais... Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999 CD-ROM.

CARVALHO, J.H.; MONTEIRO, F. C.; GIRÃO, R.N. **Conservação do Bovino Pé-Duro ou Curraleiro: Situação Atual.** EMBRAPA- Documentos.16p. Novembro, 2001. Teresina, PI.

CARVALHO, J.H de. Potencial econômico do bovino pé-duro. **Documentos 65.** Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 14f. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/65454>. Acesso em 20 out. 2014.

CHOI, K.Y.; MONKE , D.; S TOTT , J.F. Absence of bovine leucosis virus in semen of seropositive bulls. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.14, p.403-406, 2002.

CHUNG, Y.S; DIMMOCK, C.K.; MACKENZIE, A.R. Factors affecting the natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy herds. **Australian Veterinary Journal**, v.68, n.7, p.230-233, 1983.

COCKRELL, G.L.; REYES, R.A. Bovine Leukemia Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders. In: SCHALM, O. W.; FELDMAM, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology.** 5. ed. Lippincott: Williams & Willians, p. 614-619, 2000.

DA, Y.; SHANKS, R. D.; STEWART, J. A. et al. Milk and fat yields decline in bovine leukemia virus-infected Holstein cattle with persistent lymphocytosis. **PNAS USA**, v. 90, p. 6538-6541, 1993.

D'ANGELINO, J. L.; GARCIA, M.; BIRGEL, E. H. Productive and reproductive performance in cattle infected with bovine leukosis virus. **J. Dairy Res.**, v. 65, p. 693-695, 1998.

D'ANGELINO, R.H.R. **Vigilância epidemiológica das Encefalites Bovinas: Vírus da Leucemia Bovina como agente causal**. 2012. 70p. Dissertação (Mestrado) Pós – Graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. São Paulo, SP, 2012.

DANTAS, Mônica Duarte. **O feudo: A casa da torre de Garcia d' Ávila: Da conquista dos sertões à independência**. *Hispanic American Historical Review*. Durham, EUA, v.82, n.4, p.799-801, 2002.

DITTRICH, T. R. C. **Produção de reagentes para diagnóstico da infecção pelo vírus da leucose bovina**. 2004. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004

DOMINGUES, O.; SANFORD, P.; MELO, J. M. de; MAIA, A. L.; COELHO, A. A. Preservação e seleção das raças nativas de gado do Nordeste. Fortaleza: DNPV, 1956. 28 p. (DNPV. Publicação, 9).

DONOVAN, R.M. Retroviridae. In: HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. (ed.) **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 411-428, 2003.

DUCREUX, F.; ARRIETA, E.; JIMINEZ, C.; MORENO, E.; RODRIGUEZ, L. Estudios sobre leucosis viral bovina em ganado Bos indicus em Costa Rica. **Ciencias Veterinária**. v.9, p.95- 99, 1987.

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBURQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v.51, p. 39-52, 2002.

EGITO, A. A. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação**. 2007. 246p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

EGITO, A. A.; FIORAVANTI, M.C.S.; GRATTAPAGLIA, D.; RAMOS, A.F.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; MARIANTE, A. S. Origem e diversidade genética materna de populações de bovinos da raça curraleira de diferentes regiões do Brasil. **Actas Iberoamericanas de Conservación Animal**, Córdoba, v. 1, p. 110-113, 2011.

EVERMANN, J.F.; DIGIACOMO, R.F.; FERRER, J.F.; PARISH, S.M. Transmission of Bovine Leukosis Virus by blood inoculation. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, n.9, p.1885-1887, 1986.

EVERMANN, J.F.; HOPKINS, S.J.; DIGIACOMO, R.F.; PARISH, S.M.; FERRER, J.F.; SMITH, S.; BANGERT, R.L. Experimental transmission of bovine leukosis virus by simulated rectal palpation. **Veterinary Record**, v.122, p.389-390, 1992.

FAVA C. DEL; PITUCO E.M. Infecção pelo vírus da leucemia bovina (BVL) no Brasil. DIVULGAÇÃO TÉCNICA. **Instituto Biológico**, São Paulo, v.66, n.1/2, p.1-8, jan./dez., 2004.

FECHNER, H.; BLANKENSTEIN, P.; LOOMAN, A. C. et al. Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. **Virology**, v. 237, p. 261-269, 1997.

FELDMAN, W.H. Lymphosarcoma in the bovine abomasum. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v. 73, p. 206-215, 1928

FELIX G. A.; PIOVEZAN U.; JULIANO R.S.; SILVA M.C.DA; FIORAVANTI M.C.S. Potencial de uso de raças bovinas locais brasileiras: Curraleiro Pé - Duro e Pantaneiro. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p. 1715, 2013.

FELMER, R.; ZUNIGA, J.; RECABAL, M. Estudio comparativo de um PCR anidado, ELISA, IDAGA en la detección del virus da la leucosis bovina em muestras de leche, sangre y leche. **Arch. Med. Vet.** v.38 n.2 p.137 – 141. 2006.

FERNANDES, A. C. DE C. **Avaliação da leucometria na identificação da leucose enzoótica dos bovinos em rebanhos do Estado de Pernambuco**. 2012. 61p. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

FERRER, J.F.; PIPER, C.E. Role of colostrum and milk in the natural transmission of the Bovine Leukemia Virus. **Cancer Research**, v.41, p.4906-4909, 1981.

FERRER, J.F. Bovine lymphosarcoma. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v.24, p.01-68, 1982.

FENNER, J.F.; GIBBS, E.P.J.; MURPHY, F.A. **Veterinary Virology**. 2 ed. San Diego: Academic Press, 1993. Cap.33: Retroviridae: p.561 -595. 1993.

FIORAVANTI, M. C. S.; JULIANO, R. S.; COSTA, G. L.; ABUD, L. J.; CARDOSO, V. S.; CARPIO, M. G.; OLIVEIRA e COSTA, M. F. Conservación del bovino Curraleiro: cuantificación del censo y caracterización de los criadores. **Animal Genetic Resources**, Roma, v. 48, p. 109-116, 2011.

FLORES, E.F. et al., Aspectos epidemiológicos da infecção pelo vírus da leucose bovina (VLB) na região central do Rio Grande do Sul, Brasil. **A Hora Veterinária.**, n. 58, p. 25-39, 1989.

FLORES , E.F.; WEIBLEIN, R.; OLIVEIRA, C.; KREUTZ, L.C. Anticorpos contra o vírus da leucose bovina (VLB) em soro de bovinos provenientes da República Oriental do Uruguai. **Hora Vet.**, v.12, n.68, p.5-8, 1992.

[Digite texto]

FLORES, E. F., **Virologia Veterinária**, Ed. UFSM, 2007.

FLORINS, A. et al. Cell dynamics and immune response to BLV infection: A unifying model. **Frontiers in Bioscience**, v.12, n.4, p. 1520-1531, 2007.

Food and Agriculture Organization - FAO. Situação mundial dos recursos genéticos animais para agricultura e alimentação – versão resumida. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 42p, 2010.

FORBES, P.; MACKETH, B.; PEBERDY, R (1986). Mamíferos Ungulados e Lagomorfos. **Círculo de Leitores**.

GARCIA, M. et al. Efeito da infecção pelo vírus da leucose na ocorrência de mastite em bovinos. **A Hora Veterinária**, n.88, p.41-44, 1995.

GAUGHAN, J.B.; MADER, T.L.; HOLT, S.M.; LISLE, A. A new heat load index for feedlot cattle. **J Anim Sci**. v. 86, p.226-234, 2008.

GEIGI, E. M. Palaeogenetics of cattle domestication: methodological challenges for the study of fossil bones preserved in the domestication centre in Southwest Asia. **Comptes Rendus Pale**. v. 7, p. 99-112, 2008.

GIBSON, J.P., BISHOP, S.C. Use of molecular markers to enhance resistance of livestock to disease: a global approach. **Rev. Sci. Tech.** — Off. Int. Epizoot. n. 24 v.1, 343–353, 2002.

GILDEN, R. V.; LONG, C.W.; HANSON, M. Characteristics of the major internal protein and RNA-dependent DNA polymerase of bovine leukaemia virus. **Journal of General Virology**, v. 29, p. 305-314, 1975.

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

GONZÁLEZ, E.T.; OLIVA, G.A.; VALERA, A.; BONZO, E.; LICURSI, M. LEUCOSIS enzoótica bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (IDGA, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. **Anal Vet.**, v.21, p.12-20, 2001.

GOTZE, R.; ROSENBERGER, G.; ZIEGENHAGEN, G. Die leukose des rindes: Ihre hamatologische und klinische diagnosis. **Monatshefte fur Veterinarmedizin**, v.9, p. 517- 26, 1954.

GOULART, J.A. O Brasil do boi e do couro. 2 vol. Rio de Janeiro.GRD. 2ª ed. 1965.

GUTIERREZ, S. E.; DOLCINI, G. L.; ARROYO, G. H. et al. Development and evaluation of a highly sensitive and specific blocking enzyme-linked immunosorbent [Digite texto]

assay and polymerase chain reaction assay for diagnosis of bovine leukemia virus infection in cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v. 62, p. 1571-1577, 2001.

HOPKINS, S.G.; EVERMANN, J.F.; DIGIACOMO, R.F.; PARISH, S.M.; FERRER, J.F.; SMITH, S.; BANGERT, R.L. Experimental transmission of Bovine Leukosis Virus by simulated rectal palpation. **Vet. Rec.**, v.122, n.16, p.389-391, 1988.

ILRI (International Livestock Research Institute). Climate change research by **ILRI informs Stern Review on the economics of climate change**. 2011.

INSA (Instituto Nacional do Semiárido). Estado atual de conservação da raça bovina curraleiro pé-duro na região nordeste brasileira. / Patricy Andrade Salles...[et al.]-- Campina Grande: INSA/MCTI, 2013. 27p. (**Documentos Técnicos/Instituto Nacional do Semiárido, nº 3**).

ISSA, E. C.; JORGE, W.; SERENO, J. R. B. Cytogenetic and molecular analysis of the Pantaneiro cattle breed. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 41, n. 11, p. 1609-1615, nov. 2006.

ITOHARA, S.; OIKAWA, I.; TERUI, S.; MIZUNO, Y. Infectivities of bovine leukemia virus in peripheral blood lymphocytes from naturally infected cattle and their relation to persistent lymphocytosis and antibody titers. **Japanese Journal Veterinary Science**, v.47, p.807-810, 1985.

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

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**. 14.ed. México: Ed. El Manual Moderno. Cap.45: Virus tumorales y oncogencs: p. 595-607, 1992.

JOHNSON, R.; KANEENE J.B. Bovine Leukaemia Vírus and Enzootic Bovine Leukosis. **Veterinary Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 287-312, 1992.

JOHNSON, R.; KANEENE, J. B. Bovine Leukemia Virus. Part I. Descriptive Epidemiology, Clinical Manifestations, and Diagnostic Tests. **The Compendium Collection**, v. 13, n.2, p. 122-129, 1991.

JORGE, Wilham. A origem e evolução de taurinos e zebrinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 2, 2014.

JULIANO, R. S. **Aspectos sanitários e imunológicos de bovinos da raça curraleiro**. 2006. 107f. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) –Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, 2006.

JULIANO R. S.; MACHADO R. Z.; FIORAVANTI M.C.S.; ANDRADE G. M. ; JAYME V. S. Soroepidemiologia da babesiose em rebanho de bovinos da raça Curraleiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.5, p.1387-1392 set-out, 2007.

JULIANO R. S.; FIORAVANTI M.C.S.; BRITO, W.M.E.D.; ABREU, U. G.P.; SOUZA, S.N. Soroepidemiologia da leucemia bovina (LB) em bovinos Curraleiros dos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n.3, 2014.

JÚNIOR L. A. F.; BURSZTYN M. Das sesmarias à resistência ao cercamento: razões históricas dos fundos de pasto. **Caderno CRH**. Salvador, v. 23, n.59, p. 385- 400, Maio/Ago. 2010.

KETTMANN, R.; BURNY, A.; CLEUTER, Y. Distribution of bovine leukemia virus proviral DNA sequences in the tissues of animals with enzootic bovine leucosis. **Leukemia Research**, v. 2, p. 23-32, 1978.

KLINTEVALL, K.; BALLAGI-PORDÁNY, A.; NÄSLUND, K. et al. Bovine leukaemia virus: rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected calves. **Vet. Microb.**, v. 42, p.191-204, 1994.

KUCKLEBURG, C. J.; CHASE, C. C.; NELSON, E. A. et al. Detection of bovine leukemia virus in blood and milk by nested and real-time polymerase chain reaction. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 15, p. 72-76, 2003.

LARA, M.A.C. **Variabilidade genética em bovinos e bubalinos através de polimorfismos protéicos: análise populacional e suas implicações no melhoramento**. 1998.Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo. 1998.

LEISERING, A. Hypertrophy der Malpighischen Körperchen der milz. Berl. **Vet. Wes. Kgr.**, v.16, p.15-16, 1871.

LEITE, R. C.; LOBATO, Z. P.; CAMARGOS, M. F. Leucose enzoótica bovina. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**. Ano. 7, n. 24, p. 20-28, 2001.

LEWIN, H.A.; WU, M.C.; STEWART, J.A. et al. Association between BoLA and subclinical bovine leukosis virus infection in a herd of Holstein-Friesian cows. **Immunogenetics**, v.27,p.338, 1989.

LÍCIO, P. Em Defesa do Pé-duro. **Suplemento do Campo**, p.8, 1995.

LOBO, J.R. **Resposta imune inespecífica e específica humoral de bezerros curraleiro e nelore vacinados com Mycobacterium bovis – BCG**. 2009. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2009.

LOFTUS, R. T.; MACHUGH, D. E.; NGERE, L. O.; BALAIN, D. S.; BADI, A. M.; BRADLEY, D. G.; CUNNINGHAM, E. P. Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. **Animal Genetics**. v. 25,p. 265-271. 1994.

LUDERS, M. A.; **Prevalência de Anticorpos contra o Vírus da Leucose Enzoótica Bovina em fêmeas com mais de dois anos no Rebanho de Bovinos Leiteiros no Município de Mafra- SC; LAGES(SC)**. 2001. 31 f. Especialização em Sanidade

[Digite texto]

Animal, do Centro de Ciências Agroveterinárias – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2001.

MAIA, C. E. S.; COELHO, T. O. **Tradições da roça na festa do Divino Pai Eterno em Trindade (GO): comércio periódico e romaria de carros de bois.** Agrária, São Paulo, n. 3, p. 103-122, 2006.

MAMMERICK, X. M.; LORENZ, R. J.; STRAUB, O. C.; DONELLY, W.J.C.; FLENSBURG, J.C.; GENTILE, G.; MARKSON, L.M.; RESSANG, A.A.; TAYLOR, S.M. Bovine hematology. III. Comparative breed studies on the leukocyte parameters of several European cattle breeds as determined in the common reference laboratory. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin , Reihe B**, n 25, p 257- 267, 1978.

MAMOUN, R.Z.; MORISSON, M.; REBEYROTTE, N.; BUSETTA, B; COUEZ, D.; KETTMANN R.; HOSPITAL, M.; GUILLEMAIN B. Sequence variability of bovine leukemia virus env gene and its relevance to the structure and antigenicity of the glycoproteins. **Journal Virology**, v. 64 , p.4180–4188, 1990.

MANET, G.; GUILBERT, X.; ROUX, A.; VUILLAUME, A.; PARODI, A.L. Natural mode of horizontal transmission of bovine leukemia virus (BLV): the potential role of tabanids (*Tabanus spp.*) **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.22, p.255, 1989.

MARIANTE, A.S. Conservação de recursos genéticos animais:uma questão de bom senso. 1993. **Anais Simp.** Conserv, 30ª Reunião Anual da Soc. Bras. Zootec., Rio de Janeiro, Brasil, pp. 175–182. 1993.

MARIANTE, A.S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento: Raças domésticas da história do Brasil.** Brasília, Embrapa Sede, 2000, 227p

MARIANTE, A.S.; EGITO, A.A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection, **Theriogenology**, Amsterdam, v.57, p.223-235, 2002.

MARIANTE, A.S.; CAVALCANTE, N., Animals of the Discovery: Domestic Breeds in the History of Brazil. 2006. In: Embrapa (Ed.), 2nd ed. Brazil, p. 274 , 2006.

MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; PAIVA, S. R.; RAMOS, A. F. Managing genetic diversity and society needs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 127-136, 2008.

MARIANTE, A. da S.; ALBUQUERQUE, M.do S.M.; EGITO, A.A.; MCMANUS, C.; LOPES, M.A.; PAIVA; S.R.. Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. **Livestock Science**. n. 120, p. 204–212, 2009.

MARIANTE A.S.; ALBUQUERQUE M.S.M.; RAMOS A.F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros XIX Congresso Brasileiro de reprodução Animal, Recife, PE, Brasil, 25 a 27 de maio de 2011. **Anais**. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.35, n.2, p.64-68, abr./jun. 2011. Disponível em www.cbpa.org.br. 2011.

MARTIN, C. **Diagnóstico de situação educativo epidemiológico da leucose em fêmeas acima de 2 anos na espécie bovina.** Florianópolis: CIDASC, p.28, 2001.

MATOS, P.F.; BIRGEL, J.E.D.; BIRGEL, E.H. Leucose enzoótica dos bovinos: prevalência de anticorpos séricos em bovinos criados na Bahia e comparação entre resultados do teste de Elisa e da imunodifusão em gel de ágar. **Brazilian Journal of Veterinary Research the Animal Science**, v.42, p.171-180, 2005.

MATSUOKA, M.; JEANG, K.T. Human T-cell leukaemia virus ype 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nat Rev. Cancer**, v. 7, 270-280, 2007.

MAUDET,C., LUIKART, G; TABERLET, P. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellites DNA analysis. **J. Anim. Scin.** 80. 942-949. 2002.

MAZZA, M.C.M.; MAZZA, C.A.S.; SERENO, J.R.B.; SANTOS, S. A. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p. 2013, 1994.

McMANUS, C.; PALUDO, G.R.; LOUVANDINI, H.; GARCIA, J.A.S.; EGITO, A.A.; MARIANTE, A. S. Heat Tolerance in Naturalised Cattle in Brazil: Physical Factors. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v.54, n.206-207, p.453-458, 2008.

MEAS, S.; RUAS, J.; FARIAS, N.A.; USUI, T.; TERAOKA, Y.; MULENGA, A.; CHANG, K.S.; MASUDA, A.; MADRUGA, C.R.; OHASHI, K.; ONUMA, M. Seroprevalence and molecular evidence for the presence of bovine immunodeficiency vírus in Brazilian cattle. **Jpn. J. Vet. Res.**, v. 50, n.1.,p. 9-16, 2002.

MEIRELLES, C.; DITTRICH, T.; CIPRIANO, F.; RUDIGER, D.O. Evolução da soroprevalência da Leucose Enzoótica Bovina em um rebanho bovino leiteiro universitário. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina,v.30,n 3, p.671 -678, 2009.

MENDES, E.I. et al. Prevalência da Leucose enzoótica e da tuberculose dos bovinos em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco. In: **Anais do 35 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet)**; 2008; Gramado: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária. 2008.

MILLER, J.M.; et al. Virus-like particles in phytohemagglutinin- stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v.43, p.1297 – 305, 1969.

MILLER, L.D.; MILLER, J.M.; OLSON, C. Inoculation of calves with particles resembling C-type virus from cultures of bovine lymphosarcoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v.48,n.2, p.423-428, 1972.

MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. **European Journal of Cancer**, v. 13, p. 1369-1375, 1977.

MILLER, J.M.; VAN DER MAATEN, M.J. Bovine leukosis- its importance to the dairy industry in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 2194-2203, 1982.

[Digite texto]

MIRSKY, M. L.; OLMSTEAD, C.; LEWIN, H. A. Reduced bovine leukaemia virus proviral load in genetically resistant cattle. **Animal Genetics**, n 29, p 245-252, 1998.

MONKE, D.R. Noninfectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, p. 823-826, 1986.

MONTI, G.E.; Frankena, K.; Angel, K.; Angel, B.; Buist, W.; Tarabla, H.D.; M de Jong, M.C. Evaluation of a new antibody- based enzyme- linked inmunoabsorbent assay for the deteccion of bovine leucemia vírus infection in dairy cattle. **J. Vet. Diagn. Invest.** v.17, p.451- 457, 2005.

MORRIS, C.A. A review of genetic resistance to disease in *Bos Taurus* cattle.**The Veterinary Journal**, v.174, p.481-491, 2007.

MUSSGAY, M; KAADEN, O.R. Progress in studies on the etiology and serologic diagnosis of enzootic bivine leucosis. **Current Topics in Microbiology and Immunology.** v.79, p.43-72, 1978.

NEIVA, A. C. G. R.; SERENO, J. R. B.; FIORAVANTI, M. C. S. Indicação geográfica na conservação e agregação de valor ao gado Curraleiro da comunidade Kalunga. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 231, p. 357-360, 2011.

OIE. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. **International Animal Health Code**. Paris: OIE, 2003. Disponível em:<http://www.oie.int/Norms/MCode/htm>>. Acesso em: 16/08/ 2014.

OLIVEIRA, A.P.F. **Genetic characterization of a creole cattle population Pé- duro from Piauí, based on microsatellite loci**. 2008, Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, p. 112, 2008.

PELZER, K.D.; SPRECHER, D.J. Controlling BLV infection on dairy operations. **Veterinary Medicine**, p. 275-281, 1993.

PENA, N.E.B. et al.,.Prevalência serológica de leucosis bovina em ganaderias lecheras del centro de Caldas durante 1983. **Revista ICA**, n. 20, p. 106 -115, 1985.

PESSOA, A.E.S. **As ruínas da tradição: a casa da torre de garciaD’avila- família e propriedade no nordeste colonial**. 2003. 291p. Tese (Doutorado em História Social) – Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PIMENTEL C.M.; DIAS E.A.; PAIVA, S. R.; NETO, J.B.; COBUCI, J. A.; BARCELLOS J.O.J.; LOUVANDINI, H.. Os desafios da produção animal frente às mudanças climáticas. Vet. e Zootec. 2011 dez.; 18 (4 Supl. 3) **In: IX Congresso Brasileiro Buiatria**. 04 a 07 de Outubro de 2011. Goiânia - Goiás, Brasil.

PERINO, L.J.; WRIGHT, R.E.; HOPPE, K.L.; FULTON, R.W. Bovine leukosis virus transmission with mouthparts from *Tabanus abactor* after interrupted feeding. **American Journal Veterinary Research**, v.51, p.1167- 1169, 1990.

POLETTI, R.; KREUTZ, L.C.; GONZALES, J.C.; BARCELLOS, L.J.G. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. **Ciência Rural**, v.34, n.2, p.595-598, 2004.

PRIMO, A. T. El ganado bovino Ibérico en las Americas: 500 años después. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 41, p. 421-432, 1992.

RADOSTITS O.M.; GAY C.C.; BLOOD D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária - Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9 ed., 2002, p.940-951

RAMA, GONZALO. Aspectos sobre el diagnóstico de leucosis enzoótica bovina. 2009.

RANGEL, N.M.; MACHADO, A.V. Contribuição à oncologia comparada em Minas Gerais. **Arq. Esc. Sup. Vet. MG**. v.1, p. 83-96, 1943.

RANGEL, P.N.; ZUCCHI, M.I.; FERREIRA, M.E. Similaridades genéticas entre raças bovinas brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n. 1, p.97-100, 2004.

ROBERTS, D.H.; LUCAS, M.H.; WIBBERLEY, G.; CHASEY, D. Investigation into the susceptibility of cattle to Bovine Leukosis Virus following inoculation by various routes. **Vet. Rec.**, v.110, n.6, p.222-224, 1982.

RODERO, A.; DELGADO, J. V.; RODERO, E. Primitive Andalusian livestock and their implications in the discovery of America. **Archivo de Zootecnia**, Córdoba, v.41, p.383-400, 1992.

ROLA, M.; KUZMAK, J. The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR-ELISA. **J. Virol. Meth.**, v. 99, p. 33-40, 2002.

ROMANI, ALANA FLÁVIA. **Investigação soropidemiológica e molecular de brucelose e leptospirose em núcleos de conservação de gado Curraleiro Pé Duro e Pantaneiro**. 92 f. 2012. Tese (Doutorado em Ciência Animal)-Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiânia, 2012.

ROMERO, C.H.; ZANOCCHI, H. G; AGUIAR, A.A. Experimental transmission of enzootic bovine leukosis virus with blood and milk in the tropics. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 2, p. 9-15, 1982.

ROSA, A. N.; SILVA, L. O. C.; PORTO, J. C. A. **Raças mochas: história e genética**. Embrapa CNPGL. Campo Grande. 1992. 64 p.

SANTI, A. P. I. **Perfil sanitário de bovinos da raça Curraleiro frente a enfermidades de importância econômica.** 2008. 78f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

SANTIAGO, A. A. **Os cruzamentos na pecuária bovina.** São Paulo. Instituto de Zootecnia, p. 254-255, 1975.

SANTOS, J.A.; PINHEIRO, P.V.; SILVA, L.J. Linfossarcoma com lesões da língua e camaras cardíacas em bovinos. **An. Esc. Flumin. Med. Vet.** v.2, p. 1-8, 1959.

SANTOS, S.A.; McManus, C.; SOUZA, G.S.; SORIANO, B.M.A.; SILVA, R.A.M.S; COMASTRI FILHO, J.A.; ABREU, U.G.P.; GARCIA, J.B. Variações da temperatura corporal e da pele de vacas e bezerros das raças pantaneira e nelore no pantanal. **Archivos de Zootecnia**, ano/vol. 54, n.206-207, p. 237-244, 2005.

SARGEANT, J.M; SHARIF, S.; MALLARD, B.A.; WILKIE, B.N.; SCOTT, H.M., DEKKERS, J.C., LESLIE, K.E., 1997. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics** n.29, 3, 185–193

SCHOTTLER, F.; SCHOTTLER, H. Über ätiologie und therapie der aleukämischen lymphadenose des rindes. **Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr.**, v. 50, p. 497-502, 513- 517, 1934.

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

SEIKI, M.; EDDY, R.; SHOWS, T.B.; YOSHIDA, M. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. **Nature**, v.309, p.640-642, 1984.

SERRANO, G.M.S. **Uso de marcadores moleculares RAPD na caracterização genética das raças bovinas nativas brasileiras.** 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2001.

SHIMIZU, A.; SHIMIZU, N.; TANAKA, A.; JINNO-OUE, A.; ROY, B. B. ; SHINAGAWA, M.; ISHIKAWA, O.; HOSHINO, H. Human T-cell leukaemia vírus type I is highly sensitive to UV-C light. **J.Gen. Virol.** V. 85, n.8, p.2397-2406, 2004.

SHINAGAWA, T; ISHIGURO, N; HORIUCHI, M. et al. Characterization of monoclonal antibodies against Sporadic Bovines Leukosis cell lines. **J. Vet. Med. Sci.** v.56 p. 827-833, 1994.

SILVA, R.G. **Introdução à bioclimatologia animal.** São Paulo: Nobel, 2001. 286p.

SILVA, R.C.; FONTANA, I.; MEIRELLES, F.C.; RUGGIERO, A.P.M.; BENATO, N.; BORGES, J.R.J. Ocorrência de Leucose Enzoótica Bovina na forma de

linfossarcomas no Distrito Federal: relato de caso. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 4, p. 507-512, 2008.

SORENSEN, D.K. Bovine lymphotic leukemia. Epidemiologic studies. WHO Conference on Comparative Study Leukemias. Philadelphia (USA), rep. 26, 1961.

SOUZA, M.; AZEVEDO, M.S.; JUNG, K.; CHEETHAM, S.; SAIF, L.J. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus. **J.Virol.**,v.82, n.4, p.1777-1786, 2008.

SOUZA, F. N.; LATORRE, A. O.; CANICEIRO, B. D.; SAKAI, M.; KIELLING, K.; BLAGITZ, M. G.; DELLA LIBERA, A. M. M. P. Proliferação de linfócitos e apoptose de células CD5+ de bovinos infectados pelo vírus da leucose enzoótica bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.5, p.1124-1130, 2011.

SPINOLA, T. R. **Correlação entre atipia linfocitária e o perfil imunológico de animais infectados pelo Vírus da Leucose Enzoótica Bovina**. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo, 2010.

STRAUB, O.C. Enzootic Bovine Leukosis. In: Gibbs, E.P.J. (Ed.). **Virus Diseases of Food Animals**. V. II. London: Academic Press, 1981. Cap. 28, p. 683-71.

SUZUKI, T.; IKEDA, K. The mouse homolog of bovine leukemia virus receptor is closely related to the α subunit of the adapter-related protein complex AP-3, not associated with the cell surface. **Journal Virology**, v.72, p.593-599, 1998.

TABERLET, P.; COISSAC, E.; PANSU, J.; POMPANON, F. Conservation genetics of cattle, sheep, and goats. **Comptes Rendus Biologies**. v. 334.p. 247-254, 2011.

TEKES L.. Influence of management technology and parturition on antibody levels in cows with bovine leucosis. **Acta Vet. Hung.** v. 42, p. 57-67, 1994.

TIWARI, A.; VANLEEuwEN, J.A.; DOHOO, I.R.; KEEFE, G.P.; HADDAD, J.P.; SCOTT, H.M.; WHITTING, T. Production effects of pathogens causing bovine leucosis, bovine viral diarrhea, paratuberculosis, and neosporosis. **J.Dairy Sci.**, v.90, n.2,p. 659-669, 2007.

TIWARI, A.; VANLEEuwEN, J.A.; DOHOO, I.R.; KEEFE, G.P.; HADDAD, J.P.; SCOTT, H.M.; WHITTING, T. Risk factors associated with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis seropositivity in Canadian dairy cows and herds. **Prev. Vet.Med.** v.88, n.1, p. 32-41, 2009.

TOLLE, A. Zur Beurteilung quantitativer hematologischer Befunde im Rahmen der Leukose- Diagnostik beim Rind. **Zbl. Vet. Med.** v 12 p. 281. 1965.

TROIANO, L. D. C. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais anti-gp51 do vírus leucose bovina (VLB)**. Dissertação (Mestrado em Biologia) na Pós-

Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, p.101. 2009.

VALLI, V.E.O. The hematopoietic system. In: JUBB. K.V.F., KENNEDY, P.C., PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1993. Cap. 2. v. 3, p. 101-265.

VAN DER MAATEN, M.J.; MILLER, J.M.; BOOTHE A.D. Replicating type-C virus particles in monolayer cell cultures of tissue from cattle with lymphosarcoma. **Journal National Cancer Institute**, v. 52, p.491, 1974.

VAN REGENMORTEL, M.H.V.; FAUQUET, C.M.; BISHOP, D.H.L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; P RINGLE , C.R.; WICKNER, R.D.. **Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses**. Ed.7th Report. San Diego: Academic Press, 2000. 1167p. Chapter 61: Family Retroviridae

VELLOSO, L. Evolução e tendências da pecuária bovina de corte no Brasil, Produção de novilho de corte In: SIMPOSIO SOBRE PECUÁRIA DE CORTE, 4., 1996, Piracicaba, **Anais...**, Piracicaba, FEALQ, 1996. p.1-40.

VERRIER, E.; BOICHARD, M.T.; BERNIGAUD, R.; NAVES, M. Conservation and value of local livestock breeds: usefulness of niche products and/or adaptation to specific environments. **Animal Genetic Resources Information**, Roma, v. 36, p. 21-31, 2005.

VIANA, U. Sobre o gado Curraleiro, notas históricas e apontamentos sobre os bovinos no Brasil. **Jornal do Brasil**, Rio de Janeiro, 1927, 41p.

WAGNER ,H.J.; BLANKENSTEIN, P.; BONDZIO, A.; EBNER, D.; RISSE, S. Increase of antigen production in BLV-infected cell-lines via additional expression of tax. **Journal Veterinary Medical**, v.42, p.543–550, 1995.

WEIGEL, K.A.; FREEMAN, A.E.; KEHRLI Jr., M.E. et al. Association of class I bovine lymphocyte antigen complex alleles with health and production traits in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v.73, p.2538-2546, 1990.

WESTTHUSIN, M.E.; SHIN, T.; TEMPLETON, J.W.; BURGHARDT, R.C.;ADAMS, L.G. Rescuing valuable genomes by animal cloning: a case for natural disease resistance in cattle. **Journal of Animal Science**, Tokyo, v.85, p. 138-142, 2007.

WOOLLIAMS, J.A.; WOOLLIAMS, C.; SUTTLE, N.F.; JONES, D.G.; WIENER, G. Studies on lambs from lines genetically selected for low and high copper status. 2. Incidence of hypocuprosis on improved hill pasture. **Animal Production**, v.43, p.303-317, 1986.

ANEXOS

Quadro 1. Padrão Racial do Curraleiro Pé Duro

ITEM 1: Aparência geral			
Nomeclatura	Ideal	Permissível	Desclassificatório
Estado Geral	Sadio e vigoroso	Pequeno desvio do padrão ideal	Caquético e fraco.
Desenvolviment	Bom, de acordo com a idade.	Médio	Tamanho e peso muito reduzido em relação à idade.
Constituição, ossatura e musculatura.	Robusta. Ossatura forte. Musculo desenvolvido e bem distribuído.	Constituição média, regulares.	Constituição fraca ou grosseira.
Masculinidade e Feminilidade	Bem acentuada, de acordo com o sexo.	-	Características inversas
Temperamento	Ativo e dócil	Ligeiro desvio do padrão ideal	Nervoso ou bravo
ITEM 2.:Cabeça			
Aparência	Pequena, forte, proporcional ao corpo.	Média	Pesada.
Perfil	Subcôncavo	Retilíneo, côncavo	Ultraconvexo
Fronte	Larga, plana, entre órbitas, sobre a linha mediana, ligeira depressão.	Média	Protuberante
Chanfro	Machos:reto, curto e largo Fêmeas:.comprido, estreito	Médio, ligeiramente subconvexo	Torto (assimétrico)
Focinho	Preto, largo, com narinas separadas e dilatadas	Pigmentação um pouco clara	Despigmentado
Olhos	Grandes, brilhantes, docil	Cegueira acidental de um olho	Cegueira total; exoftalmia; albinismo
Orelhas	Curtas, de pontas arredondadas e atentas	Médias extremidades ponteagudas	Grandes e pendentes
Chifres	Leves, de comprimento médio, grossos na base e finos final	Mocho e banana.	forma de lira posterior touro:grandes e finos
ITEM 3 : Pescoço e corpo			
Pescoço	Machos:musculoso Fêmeas:descarnados comprimento médio, inserido à cabeça tronco. Barbela curta.	Pescoço longo, barbela média	Muito curto e excesso de barbela
Peito	Largo e profundo	Médio	Muito estreito
Linha dorso-lombar	Retilínea	Ligeiramente arqueada	Cifose, muita lordose e escoliose
Ancas / garupa	Ancas bem afastadas e igualmente salientes. Garupa comprida e larga	Médias (ancas e garupa)	Ancas muito salientes; garupa curta e estreita
Sacro	Não saliente e no mesmo nível da anca	Ligeiramente saliente	Muito saliente
Cauda/vassoura	Fina e longa com inserção harmoniosa, larga na base, fina no final, vassoura abundante e preta	Inserção alta; vassoura branca, preta e branca, amarela e nuances	Cauda excessivamente curta ou ausente

[Digite texto]

Tórax, costelas, flancos e ventre.	Tórax; largo e profundo; Costelas; largos, chatos, arqueadas e afastadas na parte posterior, sem depressão; flancos profundos. Ventre amplo, desenvolvido	Pequeno desvio do padrão ideal	Tórax deprimido (batido)
Umbigo	Reduzido	Médio	Longo e com hérnia
ITEM 4 : Membros			
Membros anteriores	Médios, fortes, bem separados, apumados e menores que os posteriores.	Pequeno desvio do padrão ideal	Muito longos ou curtos, desproporcionais ao corpo; apumos defeituosos.
Membros posteriores	De comprimento médio, coxas e pernas com boa musculatura, separadas e deixando um suficiente espaço para o úbere, nas fêmeas.	Pequeno desvio do padrão ideal	Excessivamente longos ou curtos, desproporcionais ao corpo; apumos defeituosos.
Cascos	Preto e suas nuances, médios, lisos bem conformados, resistentes.	Estrias ou claros	Mal conformados, excessivamente abertos.
ITEM 5: Órgãos genitais			
Bolsa escrotal e testículos	Pele fina, elástica, flexível e pigmentada, testículos de desenvolvimento normal.	-	Anorquidia; monorquidia; criptorquidia; hiperplasia; hipoplasia.
Bainha	Reduzida, fixada junto ao ventre	Média	Excessiva, pendulosa.
Úbere e tetas	Bem conformado, harmonioso, boa textura, quatro quartos; quatro tetas pequenas	Conformação regular e tetas médias	Menos de quatro quartos de úbere ou tetas, desde que de origem genética.
Vulva	De conformação e desenvolvimento normais; bem pigmentada	-	Atrofiada ou despigmentada
ITEM 6: Pelagem			
Cor	Variada: vermelha, amarela avermelhada ou baia, amarela e raposa; as extremidades e a cabeça mais escuras, especialmente nos machos; ocorrer ou não manchas escuras em torno dos olhos	Fusca, alaranjada, alvaça, malhada de vermelho e branco, preta, malhada de preto e branco e azulada;	Despigmentada.
Pele	Preta	Um pouco clara	Despigmentada
Pêlos	Finos, curtos e sedosos	Alopecia leve; pêlos medianos	Alopecia acentuada ou peladura
ITEM 7: Medidas			
Altura tomada à altura da cernelha:	Machos: 1,1m fêmeas: 1m	-	Alturas inferiores ao limite mínimo

[Digite texto]

TABELA 1 – OCORRÊNCIA DE LEUCOSE ENZOÓTICA EM BOVINOS NAS REGIÕES, SEGUNDO AUTOR, ANO, LOCAL, TÉCNICA, RAÇA OU APTIDÃO ZOOTÉCNICA DOS ANIMAIS

Autores	Ano	UF	n° Amostras	Positivos (%)	Técnica	Aptidão Zootécnica
Barros Filho et al	2009	PR	268	56,3	IDGA	Leite
Sponchiado	2008	PR	1089	49,0	IDGA	Leite
Birgel Júnior et al.	2006	SP	476	9,2	IDGA	Corte
Leuzzi Júnior et al.	2003	PR	624	40,7	IDGA	Leite
Megid et al.	2003	SP	1.193	47,4	IDGA	Leite e corte
Silva	2001	PI	1.976	16,9	IDGA	Leite e corte
Van Der Laan et al.	1999	RS	19.774	16,3	IDGA	Leite
Molnár et al.	1999	PA	721	49,8	ELISA	Leite e corte
Simões	1998	PB	780	8,3	IDGA	Leite
Oliveira et al.	1997	SP	1.448	31,8	IDGA	Leite
Birgel Júnior et al.	1995	SP	709	49,2	IDGA	Leite

Fonte: (D`ANGELINO, 2012).

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Experimentação com Animais – CEEA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



Teresina, 21 de Março de 2014.

Ilma.

Profa. Dra. MARIA DO CARMO DE SOUZA BATISTA
Departamento: Morfofisiologia Veterinária- CCA /UFPI

Senhora Pesquisadora

Em reunião na presente data (21 de Março de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **015/14**, o projeto de pesquisa intitulado "**Características hematológicas de bovinos curraleiro pé-duro infectados com Leucose Enzoótica Bovina em rebanhos dos Estados do Goiás e Piauí**", sob a sua responsabilidade. Informamos que no projeto serão usados 560 Bovinos *curraleiro* (360 machos e 200 fêmeas).

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,


Prof^a. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora