



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS
RELAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO

WINNIE CASTRO AMORIM E ALBUQUERQUE

Detecção, tipificação e filogenia molecular de *Papilomavírus*
***bovino* em bovinos leiteiros**

Goiânia

2017

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Nome completo do autor: **Winnie Castro Amorim e Albuquerque**

Título do trabalho: **Deteção, tipificação e filogenia molecular de *Papilomavírus bovino* em bovinos leiteiros.**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO¹**

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Winnie Castro Amorim e Albuquerque
Assinatura do (a) autor (a)

Data: 04 /05 /2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

WINNIE CASTRO AMORIM E ALBUQUERQUE

**Detecção, tipificação e filogenia molecular de *Papilomavírus*
bovino em bovinos leiteiros**

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia das
Relações Parasito-Hospedeiro da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do Título de
Mestre.

Orientadora: Dr^a. Lilian Carla Carneiro.
Co-orientadora: Dr^a. Carla Afonso da Silva
Bitencourt Braga.

Goiânia

2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Castro Amorim e Albuquerque, Winnie
Detecção, tipificação e filogenia molecular de Papilomavírus bovino
em bovinos leiteiros [manuscrito] / Winnie Castro Amorim e
Albuquerque. - 2017.
xiv, 45 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro; co-orientadora Dra.
Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2017.
Bibliografia. Anexos.
Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Papilomavírus bovino. 2. Papiloma. 3. Tipificação viral. 4.
Filogenia molecular. I. Carla Carneiro, Lilian, orient. II. Título.

CDU 578

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO
Rua 235, s/n - Setor Universitário - Goiânia/GO - CEP 74.605-090
Fones: (62) 3209.6362 - 3209.6102 - Fax: (62) 3209.6303 - e-mail: ppghrph@gmail.com



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE WINNIE CASTRO AMORIM E ALBUQUERQUE - Aos trinta e um dias do mês de março do ano de 2017 (31/03/2017), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Dras. LILLIAN CARLA CARNEIRO, MÔNICA OLIVEIRA SANTOS e MÔNICA SANTIAGO BARBOSA, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"DETECÇÃO, TIPIFICAÇÃO E FILOGENIA MOLECULAR DE Papilomavírus bovino EM BOVINOS LEITEIROS"**, em nível de MESTRADO, de autoria de WINNIE CASTRO AMORIM E ALBUQUERQUE, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. LILLIAN CARLA CARNEIRO, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1406/2016 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Dra. Lillian Carla Carneiro
Dra. Mônica Oliveira Santos
Dra. Mônica Santiago Barbosa

Aprovada / Reprovada

Aprovada
Aprovada
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata habilitada (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 30 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

sem alteração.

Dra. Lillian Carla Carneiro (IPTSP/UFG)
Dra. Mônica Oliveira Santos (UNIFAN/GO)
Dra. Mônica Santiago Barbosa (IPTSP/UFG)
Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura
Carneiro
Santos
Mônica Santiago Barbosa
José Clementino de Oliveira Neto

**Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro
da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO**

Aluno (a): Winnie Castro Amorim e Albuquerque

Orientadora: Dr^a. Lilian Carla Carneiro

Co-orientadora: Dr^a. Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga

Membros Titulares:

1. Professora Dr^a. Mônica Santiago Barbosa

2. Professora Dr^a. Mônica Oliveira Santos

3. Professora Dr^a. Lilian Carla Carneiro (presidente da banca)

Membros Suplentes:

1. Professor Dr. Aroldo Vieira de Moraes Filho

2. Professor Dr. Guilherme Rocha Lino de Souza

Data: 31.03.2017

***“E tudo quanto fizerdes por palavras ou por obras, fazei-o em nome do Senhor Jesus,
dando por ele graças a Deus Pai”.
Colossenses 3:17, Bíblia Sagrada.***

AGRADECIMENTOS

À Deus, sem ele nada seria possível.

Aos meus pais Mardem e Mércia pelo amor, carinho e confiança. Vocês são absolutamente tudo em minha vida.

Ao meu irmão Mardem Filho pelas orientações e cuidado.

Ao meu anjo da guarda e noivo Shandallyê pelo apoio incondicional, companheirismo e amor em todos esses anos.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Lilian Carla Carneiro pelo tempo dedicado, pelos ensinamento e apoio ao longo dessa jornada.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a Carla Afonso da Silva Bitencout Braga pelos ensinamentos, paciência e auxílio durante todo esse período.

Aos professores e funcionários do IPTSP/UFG por tudo que me foi passado em sala de aula e no convívio fora dela.

Aos colegas de laboratório Pedro Henrique, Raylane, Adailton, Aline Gama, Rasan, Andressa, Débora, Leandro Marcos, Leandro Túlio e todos os outros por aquecerem meu coração com a amizade de cada um de vocês. Essas lembranças levarei por toda a vida.

À Angélica, estagiária do laboratório, meu braço direito nos experimentos, meu muito obrigada pela ajuda e responsabilidade em tudo que nos foi proposto.

Às minhas amigas de infância Nilce e Vilani que mesmo distantes fisicamente nunca deixaram de se fazer presentes em minha vida.

A todos envolvidos, seja direta ou indiretamente, o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	xiv
1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA.....	1
1.1. Revisão da Literatura	2
1.1.1. Papilomavírus bovino (BPV).....	2
1.1.2. Estrutura viral e organização genômica.....	3
1.1.3. Proteínas virais e suas funções.....	5
1.1.4. Ciclo de infecção	6
1.1.5. Infecções cruzadas, diferentes sítios e aspectos clínicos das lesões ...	8
1.1.6. Epidemiologia	10
1.1.7. Técnicas de detecção do BPV.....	11
1.1.8. Filogenia molecular	11
1.1.9. Tratamento	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo geral	15
3.2. Objetivos específicos	15
4. MÉTODOS.....	16
4.1. Ética na Pesquisa	16
4.2. Coleta.....	16
4.2.1. Coleta de papilomas e preparo da amostra	16

4.2.2. Coleta de sangue	17
4.3. Extração de DNA.....	17
4.3.1. Extração de DNA em tecido	17
4.3.2. Extração de DNA em sangue.....	18
4.4. Oligonucleotídeos e reação de PCR.....	18
4.4.1. Identificação do tipo viral	18
4.4.2. Identificação da proteína β -globina bovina	20
4.5. Eletroforese em gel de agarose	21
4.6. Sequenciamento	21
4.7. Análise da sequência nucleotídica	22
4.8. Análise filogenética	23
5. RESULTADO E DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÕES.....	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXOS	42
Anexo I – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUMA.....	42
Anexo II – Imagens de papilomas e extração cirúrgica de lesões papilomatosas.	43
Anexo III - Resumo da submetido ao XXIII Congresso Latinoamericano de Microbiologia 2016.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do <i>Papilomavírus</i>	4
Figura 2. Modelo de organização genômica do BPV.....	4
Figura 3. Modelo de infecção pelo <i>Papilomavírus</i>	7
Figura 4. Modelo de expressão diferencial das proteínas virais no epitélio.	8
Figura 5. Esquema de lesões causadas pelo BPV.....	9
Figura 6. Controle da extração: β -globina bovina.	24
Figura 7. Tipagem viral das amostras de BPV.	26
Figura 8. Trechos dos alinhamentos..	28
Figura 9. Histograma da sequência nucleotídica parcial de cada tipo viral encontrado neste estudo.	30
Figura 10. Papiloma plano e pedunculados.....	43
Figura 11. Papilomas na região caudal, genital e úbere.....	43
Figura 13. Papilomas na região caudal, genital e úbere.....	43
Figura 14. Papilomas na região caudal, genital e úbere (detalhe).....	43
Figura 15. Extração cirúrgica de papilomas	44
Figura 16. Extração cirúrgica de papilomas	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na identificação do BPV.....	19
Tabela 2. Ciclo de amplificação dos oligonucleotídeos do BPV.....	20
Tabela 3. Demonstração dos resultados de PCR nas amostras coletadas de bovinos com papilomatose.....	25
Tabela 4. Tipos virais identificados nos papilomas bovinos.	27
Tabela 5. Dados de identidade, similaridade e número de acesso do BLASTn, relacionados as sequências nucleotídica amplificadas para cada tipo viral.....	28
Tabela 6. Dados de identidade, similaridade e número de acesso das sequências deduzidas de proteínas relacionadas às sequencias nucleotídicas amplificadas para cada tipo viral.....	29

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

BPV – *Bovine Papillomavirus* ou Papilomavírus bovino

DH5α – *dlacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF)* - Linhagem de bactéria *E. coli*

DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo - (CH₃)₂SO

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IPTG – Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

IPTSP/UFG – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás

kb – quilobase

LB – Meio Luria Bertani

LCR – *Long Control Region*

mA – miliampere

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

mL – Mililitro

ng – Nanograma

nm – Nanômetro

ORF – *Open Reading Frame*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pH – Potencial hidrogeniônico

PV- Papilomavírus

rpm – Rotações por minuto

TAE – Solução tampão Tris-Acetato-EDTA

USDA – *United States Department of Agriculture*

UV – Radiação ultravioleta

VLP – *Virus-Like Particles*

RESUMO

Papilomavírus bovino é o agente etiológico da papilomatose bovina, doença que desencadeia verrugas por toda pele, úbere, tetos, genitália e em casos mais graves pode desenvolver papilomas extensivos, causar neoplasia no trato digestivo e bexiga, debilitar a saúde do animal e provocar perdas na produtividade e prejuízos para a pecuária. O presente estudo possui como objetivo detectar e tipificar *Papilomavírus bovino* presentes em amostras de tecido e sangue de bovinos com papilomatose, sequenciar os tipos virais isolados, analisar as sequências nucleotídicas e a filogenia dos tipos virais detectados. Como resultado, obteve-se amplificação em cinco amostras de tecido (papiloma) de diferentes bovinos, não obtendo sucesso na amplificação das amostras de sangue. As reações de PCR revelam a presença do BPV-1 em 60%, BPV-5 em 40%, BPV-9, BPV-10, BPV-13 e BPV-14 em 20% e BPV-12 em 40% das amostras analisadas. A presença de coinfeção foi verificada em 60% das lesões analisadas, com até quatro tipos virais infectando a mesma amostra. Os alinhamentos das sequências do tipo viral 1, 5 e 14 foram validados com identidade variando de 74% a 95%. O diagrama filogenético demonstrou aproximação genética entre os tipos virais 1 e 14, ambos pertencentes ao gênero *Deltapapillomavirus*, e distanciamento entre as sequências nucleotídicas dos tipos virais 5, 9 e 14. Os papilomavírus dos tipos 5 e 9 pertencem a gêneros diferentes, *Epsilonpapillomavirus* e *Xipapillomavirus*, respectivamente, justifica-se dessa forma, a distância filogenética entre esses tipos virais, verificada no diagrama.

Palavras-chaves: *Papilomavírus bovino*, papiloma, tipificação viral, filogenia molecular.

1. INTRODUÇÃO / REVISÃO DA LITERATURA

A pecuária bovina constitui-se em um dos setores mais importantes da economia nacional. O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo (USDA, 2014), alcançando em 2015 mais de 215 milhões de cabeças. O Estado de Goiás possui 10,2% do efetivo de bovinos do Brasil, ficando atrás apenas dos Estados de Mato Grosso (13,4%) e Minas Gerais (11,4%). Do total de bovinos cerca de 10,1% correspondem ao de vacas ordenhadas com uma produção média de 1.609 litros de leite por vaca (IBGE, 2016).

A produtividade do rebanho depende diretamente do sistema de produção implantado e o manejo sanitário é imprescindível para o aumento da eficiência da produção, sanidade do animal e diminuição ou erradicação de diversas doenças infectocontagiosas que se propagam facilmente entre o rebanho, tais como: mastite, brucelose, diarreia viral, febre aftosa, papilomatose dentre outras (Dantas, Silva, Negrão 2010; Peres Neto, Zappa 2011).

A papilomatose bovina é uma doença frequente em rebanhos leiteiros, sendo causada pelo *Papilomavírus bovino* (Campo 2006), um vírus pequenos de aproximadamente 8 kb, não envelopados com DNA circular de fita dupla, que é replicado e montado no núcleo da célula hospedeira. O genoma completo do vírus consiste em três regiões, uma precoce, uma tardia e uma região não codificante (De Villiers et al. 2004; Bernard, Calleja-Macias, Dunn 2006).

A infecção se inicia quando o vírus infecta as células epiteliais da camada basal através de microlesões. O vírus é transportado até o núcleo da célula, onde primeiramente expressa as proteínas precoces que são responsáveis pela transcrição e replicação viral e à medida que o epitélio amadurece, as proteínas tardias, envolvidas na formação do capsídeo viral, são expressas (Schiller, Day, Kines, 2010).

Até o momento, o *Papilomavirus bovino* está dividido em catorze tipos diferentes, os quais se encontram bem caracterizados e classificados como BPV -1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 (Roperto et al. 2016). De acordo com o tipo viral, a doença pode causar fibropapilomas, que podem estar distribuídos por todo o corpo do animal (BPV- 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 13), nos tetos e úbere (BPV- 1, 5, 6, 9, 10), genital (BPV- 1), além de poder causar neoplasia na bexiga (BPV – 1, 2, 13, 14) e no trato gastrointestinal (BPV- 4) (Zhu et al. 2014; Lunardi et al. 2013; Roperto et al. 2016).

A papilomatose provoca lesões hiperproliferativas em forma de verrugas/papilomas, localizadas no epitélio cutâneo e/ou mucoso que geralmente tendem a regredir espontaneamente, mas podem malignizar. A presença dessas lesões causa inúmeros prejuízos aos bovinos e conseqüentemente ao pecuarista, pois depreciam o valor do animal e pode causar dificuldade em sua comercialização (Campo 2006).

Dependendo do tipo viral ou do local onde estejam os papilomas pode haver cegueira, dificuldade ou impossibilidade de ordenha/amamentação, perdas na função reprodutiva, além de servir como porta de entrada para infecções secundárias (Borzacchiello 2007). De acordo com Rector e Van Ranst (2013) já foi descrito uma variedade de papilomavírus que infectam uma grande diversidade de mamíferos, aves e répteis, sendo o ser humano a espécie mais intensamente estudada com relação à infecção por este vírus (Munday 2014)

A retirada cirúrgica e cauterização dos sítios das lesões, vacinas autógenas, auto-hemoterapia e a utilização de produtos químicos, são os tratamentos mais comuns para a papilomatose bovina. Entretanto, possuem eficiência variável, resultados contraditórios e muitas vezes, há necessidade de aplicações repetidas para a cura ou apenas para o controle da doença no rebanho (Muro, Bottura, Piccinin 2008).

A transmissão pode ocorrer de múltiplas maneiras, geralmente por meio do contato físico entre animais ou com objetos contaminados (Nasir, Campo 2008). Mesmo sendo uma doença de fácil contágio, que afeta a saúde do animal, ainda é negligenciada e causa elevadas perdas econômicas. Por não ser uma doença de notificação compulsória, não existem dados oficiais sobre a real prevalência no rebanho brasileiro.

1.1. Revisão da Literatura

1.1.1. Papilomavírus bovino (BPV)

O aumento populacional de bovinos por propriedade, a utilização de material genético de outras regiões, alteração do manejo reprodutivo e sanitário, são alguns dos fatores que predispõem os animais a uma série de doenças que podem se disseminar facilmente no rebanho (Poletto et al. 2004). Dentre elas está a papilomatose bovina, doença viral causada pelo Papilomavírus (PV), capaz de produzir lesões tumorais no epitélio cutâneo e mucoso (Claus et al. 2007). Infectam células basais do epitélio

induzindo-as à formação de lesões, geralmente benignas, com tendência a regressão, mas em condições especiais, com a ação sinérgica de cofatores genéticos/ambientais, podem progredir para neoplasia (Bocaneti 2014).

De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2016), os PV pertencem à família *Papillomaviridae* e são classificados em 39 gêneros, de acordo com a sequência da ORF (*Open Reading Frame*) L1. Destes gêneros, apenas quatro parasitam bovinos, sendo *Deltapapillomavirus* (BPV-1, 2, 13, 14), *Epsilonpapillomavirus* (BPV- 5, 8), *Xipapillomavirus* (BPV-3, 4, 6, 9, 10, 11, 12) (Bernard et al. 2010; Munday 2011; Pang et al. 2014) e o BPV-7 que foi proposto para pertencer ao gênero *Dyoxipapillomavirus* (Ogawa et al. 2007; Rector, Van Ranst 2013).

O BPV – 1 e 2 infectam queratinócitos e fibroblastos e estão associados aos fibropapilomas na pele, podendo localizar-se ao longo do corpo, úbere, tetos e órgãos genitais (Dias et al. 2012). Entretanto, podem ser encontrados em outros tecidos como o epitélio transicional da bexiga (Roperto et al. 2008), epitélio coriônico da placenta (Roperto et al. 2012), além de líquidos corporais como sangue, leite, urina e sêmen (Lindsey et al. 2009; Campos et al. 2013).

O BPV – 3 e 6 infectam somente queratinócitos, sendo lesões puramente epiteliais (Borzacchiello, Roperto 2008). BPV – 4 é agente infeccioso de mucosa e pode causar lesões malignas no esôfago e trato gastrointestinal (Lindsey et al. 2009). BPV - 5 está relacionado a fibropapilomas no úbere. BPV – 7, 8, 9, 10 e 11 são papilomas epiteliais (Borzacchiello, Roperto 2008; Hamata, Nobumoto, Kanno 2008). BPV – 12 ainda é pouco descrito em artigos científicos, mas já foi classificado como papiloma epitelial (Zhu et al. 2014). BPV – 13 causa fibropapilomas e também, é bastante relatado como causador de sarcomas em equinos, como os demais *Deltapapillomavirus* (Lunardi et al. 2013) e o BPV- 14 causa lesões no epitélio cutâneo e está associado a tumores de bexiga (Roperto et al. 2016). Contudo, existem inúmeros relatos de diferentes lesões com morfologia característica a de um tipo viral, sendo causada por outro tipo do vírus (Claus et al. 2009).

1.1.2. Estrutura viral e organização genômica

O BPV é um vírus pequeno, não envelopado, constituído por uma fita dupla de DNA circular com cerca de 8000 pares de bases, complexados com proteínas histonas e

contido dentro de um capsídeo icosaédrico, medindo cerca de 55-60 nm de diâmetro (Modis, Trus, Harrison 2002) (Figura 1). O genoma viral tem uma estrutura constante, independentemente do local ou tipo de lesão (Campo 2006).

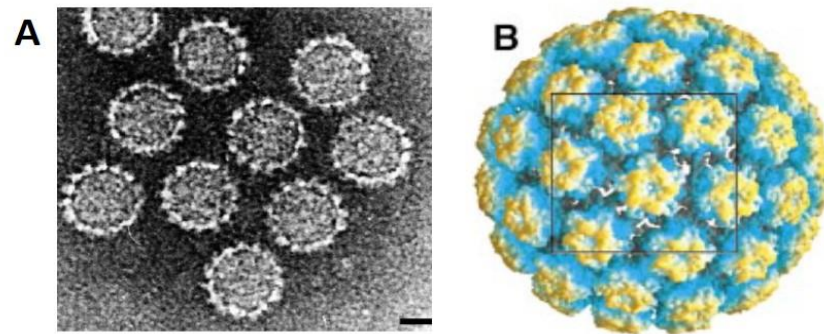


Figura 1. Estrutura do *Papilomavírus*. A. Partículas isoladas do PV. B. Modelo atômico colorido do *Papilomavírus*. Fonte: Modis Trus, Harrison 2002; Catroxo et al. 2013.

O BPV é constituído por três regiões distintas, uma LCR (*Long Control Region* – Região Longa de Controle) e duas ORFs (*Open Reading Frames*). A LCR é uma região não codificante do genoma, que contém entre 500 e 1000 pares de bases, ocupa cerca de 10% do genoma viral e nesta região se encontra a origem de replicação e múltiplos locais de ligação para os repressores e ativadores dos fatores de transcrição. As ORFs estão divididas em oito sequencias codificantes, que correspondem aos genes de expressão precoce (*early – E*) e de expressão tardia (*late – L*) (Borzacchiello, Roberto 2008) (Figura 2).

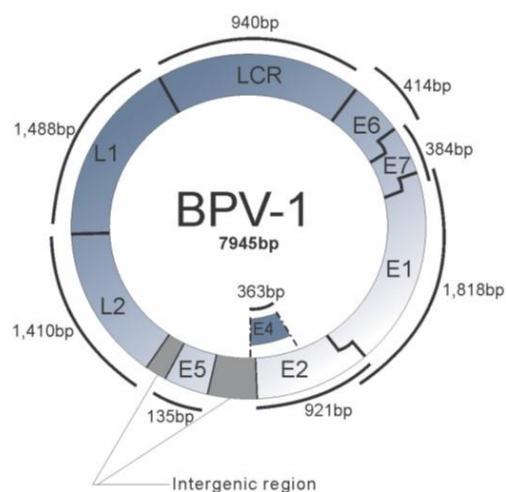


Figura 2. Modelo de organização genômica do BPV. O genoma viral está representado em círculo demonstrando a posição dos genes precoces, tardios e LCR. Fonte: Freitas et al. 2011.

Os segmentos de expressão dos genes precoces possuem seis ORFs, correspondendo aos genes E1, E2, E4, E5, E6, E7, os quais codificam proteínas envolvidas nos processos de replicação, transcrição e transformação celular, ocupando 50% do genoma viral. Os segmentos de expressão dos genes tardios são compostos por duas ORFs, correspondentes aos genes L1 e L2, responsáveis pela expressão das proteínas estruturais do capsídeo viral, representando 40% do genoma viral (Borzacchiello; Roperto, 2008). Dependendo do tipo viral, pode haver algumas alterações quanto a presença ou ausência de alguma ORF (Buck et al. 2005).

1.1.3. Proteínas virais e suas funções

O capsídeo viral é formado por proteínas codificantes dos genes tardios L1 e L2, que juntos formam 72 subunidades proteicas em formato icosaédrico. O gene da L1 é a região mais conservada dos PV e ambas as proteínas tardias são expressas nas camadas superiores do epitélio (Doorbar et al. 2012).

A proteína L1 possui como principal função a ligação do vírus a superfície celular e tem a capacidade de se auto montar espontaneamente na ausência de L2, originando partículas simétricas não infecciosas conhecidas como partículas semelhantes ao vírus (*Virus-Like Particles* – VLP) (Day, Schiller 2009). A proteína L2 facilita a encapsulação do genoma, sendo indispensável para a infectividade (Wang, Roden 2013).

Os genes precoces E1 e E2 atuam na replicação do DNA viral e transcrição dos demais genes, respectivamente. A proteína E1 possui um alto grau de conservação no genoma viral, sendo essencial para a replicação e amplificação do epissoma viral no núcleo da célula infectada, além de atuar como helicase dependente de ATP (Bergvall, Melendy, Archambault 2013). A proteína E2 atua na regulação da transcrição, início da replicação, particionamento do DNA viral e empacotamento do DNA durante a montagem viral (Mcbride 2013).

O gene E3, que codifica a proteína de mesmo nome, está presente em uma minoria dos PV e sua função ainda é desconhecida (Rivoire et al. 2006). O gene E4 está localizado dentro da ORF E2, responsável pela expressão da proteína E4, que possui funções de penetração viral nas células basais e perturbação da integridade da queratina, sendo responsável pelo efeito citopático (Doorbar 2013).

O gene E5 codifica um polipeptídeo hidrofóbico transmembrana curto, de 44 aminoácidos, que possui atividade oncogênica. O polipeptídeo E5 é expresso na membrana do complexo de Golgi e retículo endoplasmático das células da camada basal e parabasal do epitélio infectado, além de células neoplásicas. A proteína E5 interage com várias proteínas transmembranas e promove uma alteração do pH, alcalinizando o meio e provoca o sequestro de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade I e II (MHC - I e MHC – II) que, conseqüentemente, provoca uma evasão ao sistema imune (Borzacchiello 2008).

Os genes E6 e E7 se encontram na mesma ORF e codificam proteínas responsáveis pela estimulação e transformação das células, cooperando para a imortalização celular. A proteína E6 é capaz de se associar a proteína p53 e também a E6 ubiquitina ligase, provocando a ubiquitinação da p53 e conseqüente degradação proteolítica, bloqueando assim a via apoptótica (Howie, Katzenellenbogen, Galloway 2009; Doorbar et al. 2012). A proteína E7 é uma fosfoproteína que é capaz de associar-se a proteínas envolvidas na proliferação celular, entre elas a proteína do retinoblastoma (pRb), Cdkp21, p27, resultando na malignização celular (Doorbar et al. 2012; Roman, Munger 2013).

1.1.4. Ciclo de infecção

O vírus da papilomatose bovina inicia a infecção quando atinge as células basais do epitélio, possivelmente por microlesões (Schiller, Day, Kines 2010), onde se dividem e se espalham lateralmente para permitir a manutenção do genoma viral (Zur Hausen 2002). Os PV são formados por um grupo de vírus antigo e bem adaptado, que evoluíram juntamente com seus hospedeiros e, devido a essa evolução, grande parte das infecções são assintomáticas ou subclínicas, mantendo-se imperceptíveis ao longo do tempo (Rector, Van Ranst, 2013).

As microlesões expõem a membrana plasmática das células que contêm peptideoglicanos de sulfato de heparina, estrutura celular responsável pela ligação à proteína do capsídeo viral L1, gerando uma mudança na conformação viral que expõe, por sua vez, a proteína L2 (Schiller, Day, Kines 2010). A L2 é clivada pela proteína furina e surge outra modificação estrutural que permite a ligação do vírus à proteína

integrina $\alpha 6$. A partir desse momento, os vírus penetram na célula por endocitose (Hartl et al. 2011; McBride et al. 2012) (Figura 3).

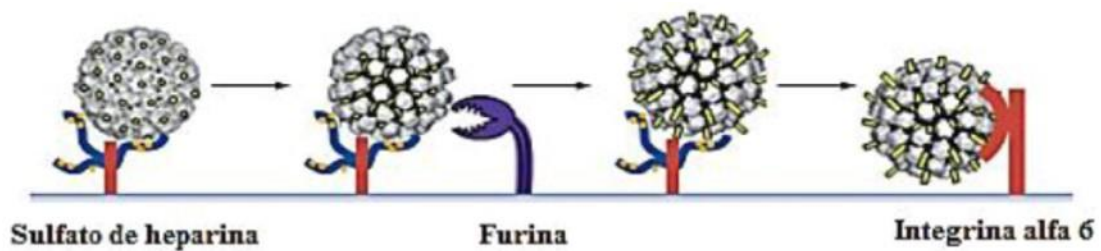


Figura 3. Modelo de infecção pelo Papilomavírus. Eventos na superfície celular durante a entrada do PV na célula hospedeira. A proteína L1 do capsídeo viral se liga aos receptores de sulfato de heparina presentes na membrana da célula hospedeira. Essa ligação resulta em uma mudança na conformação que expõe a proteína L2, que logo é clivada pela proteína furina que leva a uma segunda mudança conformacional e permite a ligação do vírus à proteína $\alpha 6$, resultando na internalização viral. Fonte: Day, Schiller 2009 (modificado).

O vírus é transportado para o núcleo e inicia a síntese das proteínas precoces (Maglenon, McIntosh, Doorbar 2011). Para a infecção se tornar produtiva, são necessárias a diferenciação terminal e queratinização (Doorbar et al. 2012), pois o ciclo do PV se processa juntamente com o amadurecimento do epitélio escamoso e estratificado da pele e mucosa. A expressão dos genes virais se processa à medida que as células infectadas da camada basal amadurecem e migram em direção à superfície do epitélio (Doorbar 2005).

O PV expressa os genes tardios, responsáveis pelo capsídeo viral, quando as células infectadas atingem as camadas superiores do epitélio (Figura 4). A partir desse momento, ocorre a montagem do vírus, em uma região próximo à superfície celular. A liberação da partícula viral acontece com a descamação normal do epitélio, não ocorrendo lise celular (Doorbar 2006).

O epitélio normal também é aceito como sítio latente da infecção, pois é possível encontrar o genoma viral em pele íntegra, sem que haja qualquer sinal clínico da doença (Antonsson, Hansson 2002). A disseminação do vírus da papilomatose bovina pode ocorrer pelo contato direto, animal para animal; por contato com objetos contaminados como cercas, cocho, cordas, piquete, pistolas dosadoras, agulhas de injeções, material de

castração; por meio de vetores artrópodes como moscas, carrapatos e outros insetos hematófagos (Finlay et al. 2009); bem como por transmissão vertical (Freitas et al. 2003).

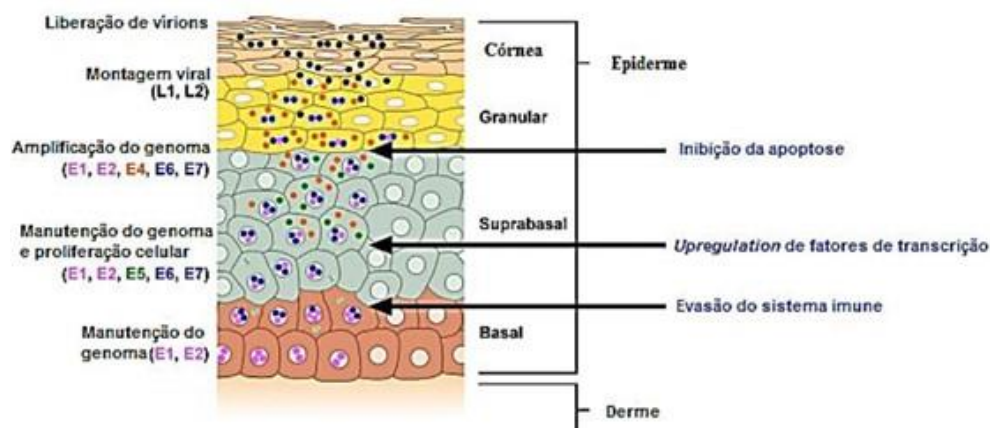


Figura 4. Modelo de expressão diferencial das proteínas virais no epitélio.

Fonte: Venuti et al. 2011 (modificado).

1.1.5. Infecções cruzadas, diferentes sítios e aspectos clínicos das lesões

A grande maioria dos PV são altamente espécies-específicos, infectando apenas o seu hospedeiro natural. Entretanto, os *Deltapapillomavirus* são uma exceção a essa regra, pois podem infectar além dos bovinos, cavalos, zebras, antas, búfalos (Freitas et al. 2011; Munday 2014), girafas (Van Dyk, et al. 2011) e felinos (Munday, Knight. 2010).

O BPV já foi identificado em diferentes tecidos e fluídos tais como placenta, líquido amniótico, sêmen, espermatozoides (Lindsey et al. 2009) oócitos, ovário, útero, fluído uterino (Carvalho et al. 2003) e também linfócitos no sangue periférico, fato que sugere, além da transmissão vertical, um possível reservatório da doença (Roperto 2011).

Existe uma enorme variedade de doenças e complicações relativas a infecções no aparelho reprodutor de bovinos que tanto podem afetar a fertilidade quanto transmitir agentes patogênicos durante o acasalamento, a transferência de embriões ou em processos de fertilização assistida (Joya et al. 2011). No caso do BPV, o mesmo tem sido encontrado no trato genital de bovinos, mesmo sem apresentar papilomatose cutânea. Logo, é necessário o controle rigoroso do vírus da papilomatose bovina, em procedimentos de reprodução (Carvalho et al. 2003).

As lesões papilomatosas podem atingir a pele, mucosa e alguns órgãos e se classificam em típica (pedunculada), atípica basal, atípica engastada e filamentosa (papiloma cutâneo situado nas glândulas mamárias). Os papilomas típicos ou

pedunculados possuem aspecto semelhante a couve-flor, sendo bastante firmes; os atípicos basais possuem aspecto achatado, planos e são circulares; os atípicos engastados possuem formação globosa encapsulada, delimitada e profunda; os filamentosos possuem aspecto fibroso de “grão de arroz”, implantação fina e superfície bastante queratinizada (Monteiro et al. 2008a) (Figura 5).

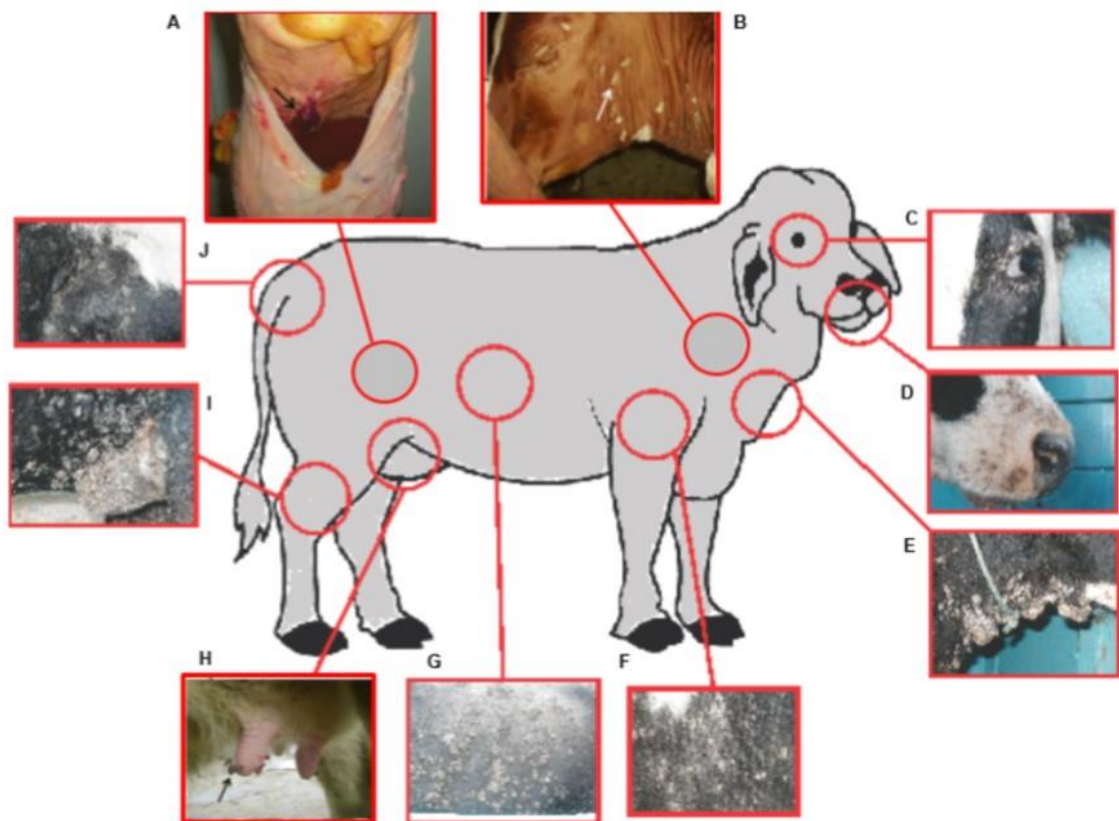


Figura 5. Esquema de lesões causadas pelo BPV. Detalhes de papilomas em diferentes regiões do corpo: A. Bexiga urinária; B. Esôfago; C. Papilomas na região dos olhos; D. focinho; E. Barbela; F. Braço; G. Abdômen lateral; H. Tetos; I. Perna; J. Rabo. Fonte: Freitas et al. 2011; Bocaneti et al. 2014 (modificado).

As lesões podem variar de cinza a preto, nos papilomas típicos e atípicos, e de rosa a esbranquiçada nos papilomas filamentosos, situado nas glândulas mamárias. Já os locais mais comuns dos papilomas cutâneos são o abdômen lateral, barbela, focinho, pescoço, dorso, glúteo, cabeça, teto, úbere e ânus, mas podem se desenvolver em qualquer parte do corpo. As áreas mais acometidas são aquelas com maior irrigação sanguínea e com sítios mais traumatizados, em consequência de atritos com cochos ou cercas, por exemplo (Monteiro et al. 2008a).

1.1.6. Epidemiologia

O BPV é um agente de distribuição mundial, já tendo sido identificado em bovinos de todo o mundo (Freitas et al. 2011). Animais jovens, de até dois anos, são os mais acometidos devido, principalmente, a sua imunidade. Estudos indicam que a maioria dos bovinos irá desenvolver papilomas em algum momento da vida (Rector, Van Ranst 2013). Bovinos mantidos em sistema de confinamento estão mais predispostos à doença (Muro, Bottura, Piccinin 2008).

Dados epidemiológicos sobre a ocorrência da papilomatose bovina são escassos, fragmentados e muitas vezes divergentes. Um estudo realizado com 1657 bovinos revelou que um terço deles possuíam papilomas no momento do abate (Lindholm et al. 1984). Dantas, Silva e Negrão (2010) relatam que a doença pode acometer de 30% a 75% do rebanho. Outro estudo estima que 60% do rebanho brasileiro possa ser infectado com pelo menos um tipo do vírus (Stocco et al. 2003; Catroxo et al. 2013).

Contraditoriamente, os dados epidemiológicos levantados por Marins (2004) nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo com 3.140 bovinos de diferentes raças, idade e sexo revelou uma prevalência da papilomatose em apenas 275 animais (8,76%). E também, num estudo conduzido por Da Silva e colaboradores (2004) em 19 propriedades rurais do estado de Goiás com aproximadamente 17.920 bovinos revelou uma prevalência de cerca de 3,68% de bovinos com papilomatose em cada propriedade.

A incidência de coinfeção também é alta, podendo existir dois, três ou mais tipos de papilomavírus na mesma lesão (Schmitt, Fiedler, Müller 2010). A maioria das lesões cutâneas é autolimitante, ou seja, regridem espontaneamente, embora possa ocorrer lesões generalizadas, persistentes, que predispõe o animal a hemorragias, miiase ou infecções secundárias, que tanto podem ser decorrentes de uma resposta imunológica insuficiente, quanto da ocorrência de diferentes tipos virais na mesma lesão (Munday 2014).

A doença está amplamente difundida e o número de casos que ocorre é infinitamente maior ao que é descrito na literatura (Da Silva et al. 2004). Contudo, há alguns fatores relevantes para a progressão da papilomatose bovina como a idade do animal, receptividade genética, manejo adequado, estruturas contaminadas e a imunodeficiência do animal (Freitas et al. 2011).

1.1.7. Técnicas de detecção do BPV

Existem diversos testes para a detecção do BPV, as técnicas de isolamento viral em cultura de células são geralmente empregadas para a identificação viral (Varella et al. 2005). Entretanto, o vírus da papilomatose depende diretamente do amadurecimento epitelial para se tornar produtivo (Zur Hausen 2002) e isso torna o seu crescimento em cultura inviável (Leto et al. 2011).

A identificação clínica e histopatológica das lesões são métodos amplamente empregados. O diagnóstico clínico é o método mais simples e rápido, pois se trata de uma doença com expressão bem caracterizada e a simples observação dos papilomas a olho nu já é o diagnóstico da doença. Contudo, se os achados epiteliais não forem patognomônicos ou para uma melhor confirmação diagnóstica, faz-se a biópsia excisional e análise histopatológica (Monteiro et al. 2008a; Leto et al. 2011).

A identificação molecular do DNA viral também pode ser realizada por meio de técnicas de hibridização (*Dot blot*, *Reverse blot*, Hibridização *in situ*, captura híbrida), PCR e sequenciamento (Leto et al. 2011). As técnicas de PCR são largamente utilizadas para a identificação e distinção dos tipos de PV (Ogawa et al. 2007; Claus et al., 2007; Lindsey et al., 2009; Cota et al. 2015; Roperto et al., 2016). É uma técnica de alta sensibilidade e especificidade e tornou-se a técnica mais indicada para os casos com pouca quantidade de material genético (Leto et al. 2011).

O Sequenciamento de DNA determina a ordem dos nucleotídeos num fragmento de DNA, sendo a representação do genoma. Com os avanços tecnológicos atuais, é uma técnica rápida e de fácil manipulação, altamente reprodutível e de baixo custo, sendo o método diagnóstico de escolha para confirmar os resultados da PCR (Carvalho, Silva 2010).

1.1.8. Filogenia molecular

O sequenciamento genômico ampliou a compreensão biológica da diversidade evolutiva de cada organismo, reconstruindo sua evolução desde o primordial organismo ascendente (Rinke et al. 2013). Nos processos evolutivos, as populações são alteradas ao longo do tempo por uma série de fatores que envolvem transferências, ganhos ou perdas de genes que podem resultar tanto em evolução quanto em extinção. Dados moleculares que incluem ácidos nucleicos (DNA e RNA) e proteínas podem ser utilizados para

construir essas ligações evolutivas e são esquematizadas e analisadas por meio dos diagramas filogenéticos (Marchler-Bauer et al. 2009).

A um nível evolutivo, a família *Papillomaviridae* é constituída por uma gama de representantes que podem parasitar quase todas as espécies de mamíferos e aves. Em toda a família, há genes que se mantem bem conservados como é o caso, por exemplo, dos genes L1 e E1 e também, há inúmeros pontos do genoma viral muito susceptível há mutações genéticas aleatórias ou mesmo ao acúmulo delas, além disso, o DNA de alguns tipos de PV pode se integrar ao cromossomo da célula hospedeira, fato responsável pela malignização dessa patologia (Doobar 2006).

A classificação taxonômica é baseada na sequência do gene L1, proteína mais conservada do genoma viral. Assim, uma diferença maior que 10% na sequência nucleotídica da L1, define um novo tipo viral, entre 2 e 10%, define um novo subtipo viral. A diferença menor que 2% da sequência da proteína L1, define uma nova variante viral. Cada tipo de BPV está relacionado a um tipo específico de lesão histopatológica (De Villiers et al. 2004).

1.1.9. Tratamento

Estão disponíveis alguns tipos de tratamentos para a papilomatose bovina, tais como remoção cirúrgica, tratamento químico-corrosivo, tratamentos homeopáticos e fitoterápicos, utilização de vacinas autógenas, auto-hemoterapia e medicamentos como o clorobutanol e o diaceturato de diaminazene (Marins 2004).

A remoção cirúrgica geralmente é realizada quando o número de papilomas é reduzido. A retirada de alguns papilomas pode estimular o sistema imunológico e provocar a queda das lesões semelhantes (Hama, Matsumoto, Franceschini 1988). O tratamento químico-corrosivo à base de soda, formalina, nitrato de prata, etc., é aplicado somente nas verrugas até o desaparecimento das mesmas. Para os animais que apresentam poucas lesões papilomatosas é recomendado o tratamento cirúrgico e o químico-corrosivo; nos casos de grande quantidade de papilomas ou lesões extensas, recomenda-se o tratamento sistêmico (Dantas, Silva, Negrão, 2010).

Os tratamentos homeopáticos e fitoterápicos mostram-se como uma alternativa para a papilomatose, pois os medicamentos apresentam pouco ou nenhum efeito colateral, possui baixa toxicidade e são de exigência terapêutica na Pecuária Orgânica

devido à ausência de resíduos tóxicos nos produtos de origem animal (Marins 2004). Marins e colaboradores (2006), também realizaram um estudo homeopático e fitoterápico com a planta *Thuya occidentalis* no tratamento de bovinos com papilomatose. O tratamento homeopático, por ingestão oral, obteve 61,11% de remoção completa dos papilomas, percentual um pouco mais alto quando comparado ao tratamento fitoterápico, por meio de pulverização de tintura mãe de *Thuya occidentalis* que obteve 50% de recuperação completa das lesões.

As vacinas autógenas têm caráter curativo, fabricadas com papilomas colhidos do próprio rebanho. Os animais mais jovens, que apresentam poucas lesões e que são acometidos por papilomas do tipo pedunculado, apresentam os melhores resultados de regressão ou cura (Dantas, Silva, Negrão 2010). Já a auto-hemoterapia consiste na retirada e aplicação imediata de sangue venoso em via intramuscular. Esse procedimento gera uma resposta imunológica inespecífica que pode resultar na queda dos papilomas (Muro, Bottura, Piccinin 2008).

Clobutanol e diaceturato de diaminazene são medicamentos utilizados no tratamento da papilomatose bovina. O primeiro é um medicamento administrado por via subcutânea, na dosagem de 50 a 100 mg/kg/PV. O segundo é um agente quimioterápico sintético, utilizado no tratamento de bovinos infectados com *Babesia spp.* e útil no tratamento contra a papilomatose. É administrado por via intramuscular na dose de 3,5 mg/kg/PV, todos de acordo com as recomendações do fabricante (Dantas, Silva, Negrão 2010).

Inúmeros tratamentos para a papilomatose estão disponíveis, geralmente a terapêutica é utilizada combinando vários tratamentos conjuntamente. Contudo, quando testados, a grande maioria não possui o efeito desejado, sendo necessária muitas repetições e muito tempo de tratamento, as vezes sem sucesso. Informações científicas sobre a eficácia dos tratamentos também são escassas. Na maioria das vezes, devido aos insucessos no tratamento, o produtor acaba descartando precocemente o animal e acumulando prejuízos econômicos (Da Silva et al. 2004).

2. JUSTIFICATIVA

A bovinocultura brasileira é uma atividade desenvolvida em todos os Estados e possui enorme importância econômica e social, sendo de grande destaque no agronegócio mundial (MAPA 2016). O mercado consumidor interno e externo exige cada vez mais produtos de qualidade, certificados, com preços adequados, levando-se em conta a sanidade, o bem-estar animal e a segurança alimentar (Zanin et al. 2015).

Entretanto, há inúmeros fatores que podem acometer a saúde e a quantidade da criação, dentre eles destaca-se o grande número de animais por área, ausência de inserção de novas tecnologias disponíveis, manejo sanitário deficiente, ausência de políticas públicas eficientes e aparecimento de diversas doenças que afetam a saúde do rebanho (Zanin et al. 2015).

Dependendo do local da lesão, o bovino fica sujeito a uma série de transtornos que variam desde estéticos, com danos ao couro, até a perda ou diminuição da função de lactação, visão, função reprodutiva e neoplasias de bexiga e trato gastrointestinal, para os casos mais graves. Esses fatores causam perdas econômicas significativas no rebanho e consequentes prejuízos econômicos para o produtor e a indústria de carne, leite e couro (Monteiro et al. 2008a).

A identificação dos tipos virais de BPV circulantes na região e sua prevalência, são fundamentais para a compreensão das características epidemiológicas da papilomatose bovina (Claus et al. 2009), bem como para contribuir em perspectivas futuras, para o desenvolvimento de um tratamento eficaz contra o BPV.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Detectar e tipificar *Papilomavírus bovino* presentes em amostras de tecido e sangue de bovinos leiteiros com papilomatose, sequenciar os tipos virais e realizar filogenia molecular dos tipos virais sequenciados.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar a presença de coinfeção viral, tanto nas amostras de tecido quanto nas amostras de sangue;
- Correlacionar os dados obtidos na tipificação viral em amostras de tecido e sangue total;
- Sequenciar os tipos virais encontrados;
- Analisar as sequências nucleotídicas;
- Realizar filogenia molecular dos tipos virais sequenciados.

4. MÉTODOS

4.1. Ética na Pesquisa

O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, processo nº 049-14, da Universidade Federal de Goiás (Anexo I).

4.2. Coleta

Foram coletadas um total de 30 amostras em nove animais, sendo 25 de papilomas cutâneos e 5 de sangue. Todos os animais participantes da pesquisa eram da raça Girolanda, de ambos os sexos e idade variando entre nove meses a dois anos, provenientes de dois municípios do Estado de Goiás, Goiânia e Jataí. Todas as coletas foram realizadas por um médico veterinário, empregando-se técnicas assépticas.

4.2.1. Coleta de papilomas e preparo da amostra

Para a coleta de papilomas, fez-se a tricotomia na região escolhida e antisepsia com solução de iodo a 10%. Em seguida, foi realizado bloqueio anestésico em L em torno do papiloma, utilizando-se cloridrato de lidocaína e epinefrina (Anestésico L Pearson®, Eurofarma). Com o local anestesiado, o papiloma foi extraído cirurgicamente e armazenado em tubos de polipropileno de 50 mL, identificados com o número do animal e local do papiloma. Ao término da extração, o local foi suturado com fio de nylon 0,60 mm, com ponto simples separado. Utilizou-se iodo tópico a 10% e um cicatrizante/repelente (Mata Bicheira Aerossol Ceva®, Ceva) sobre a ferida cirúrgica. Todos os materiais utilizados no processo de coleta estavam devidamente esterilizados. Os papilomas coletados foram conservados em caixa térmica e transportados ao Laboratório de Microbiologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), onde foram mantidos a uma temperatura de 4°C até o processamento.

O processamento dos papilomas foi realizado individualmente, sendo que as amostras com excesso de queratina nas porções mais externas do papiloma foram

retiradas e o tecido subcutâneo foi cortado em pequenos fragmentos com bisturi estéril e procedida a extração do DNA.

4.2.2. Coleta de sangue

A coleta de sangue foi realizada a vácuo. Para tanto, uma antissepsia foi feita na região ventral da cauda do bovino com iodo a 10% e uma agulha 25 x 0,8 mm foi introduzida perpendicularmente na veia coccígea. O sangue foi coletado em tubos com EDTA, conservados em caixa térmica a 8°C e transportados ao Laboratório de Microbiologia do IPTSP/UFG, onde foram mantidos refrigerados a 4°C até a realização do processo de extração do DNA.

4.3. Extração de DNA

4.3.1. Extração de DNA em tecido

A extração do DNA das amostras de tecido de bovinos foi realizada conforme o protocolo do *kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, USA). Primeiramente, foi preparado o tecido, retirando-se aproximadamente 20 mg da porção subcutânea de cada papiloma, com bisturi estéril. O tecido retirado foi cortado em vários fragmentos menores. Em seguida, o material foi transferido para tubos de polipropileno de 1,5 mL, acrescidos de 600 µL de solução de lise de ácidos nucleicos (*Nucleic Lysis Solution*), homogeneizados por 10 segundos e incubados por 30 minutos a 65°C.

Após o preparo do tecido, realizou-se a lise e precipitação de proteínas, adição 3 µL de solução de RNase e incubação a 37° C por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se 200 µL da solução *Protein Precipitation Solution*. Os tubos foram levados ao vórtex por 15 segundos, em seguida incubados por cinco minutos no gelo. Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 13.000g por quatro minutos.

A precipitação e reidratação do DNA iniciou-se transferindo todo o sobrenadante para novos tubos de polipropileno de 1,5 mL, acrescentando-se 600 µL de isopropanol. A mistura foi centrifugada por um minuto. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 600 µL de álcool 70%, centrifugando-se novamente por um minuto. Aspirou-se o álcool e os

tubos foram postos para secar por 15 minutos. Adicionou-se 100 µL de DNA *Rehydration Solution* e tubos ficaram a 4°C até o uso da amostra.

4.3.2. Extração de DNA em sangue

A extração do DNA em amostras de sangue foi realizada conforme o protocolo do *Kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, USA). Primeiramente realizou-se a lise das células sanguíneas utilizando 300 µL de sangue de cada amostra e 900 µL da solução de lise celular (*Cell Lysis Solution*), em tubos de polipropileno de 2 mL. Misturou-se por inversão e incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada por 20 segundos a 13.000 g. Descartou-se o sobrenadante e utilizou-se o vórtex por 30 segundos em cada tubo.

Para a lise nuclear e precipitação de ácidos nucleicos adicionou-se 300µL de solução de lise de ácidos nucleicos (*Nucleic Lysis Solution*) e misturou-se por inversão. Logo em seguida, adicionou-se 100 µL de precipitado de proteína (*Protein Precipitation Solution*), utilizou-se o vórtex por 20 segundos e, posteriormente, centrifugou-se por três minutos a 16.000 g.

Na precipitação e reidratação do DNA, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de polipropileno de 1,5 mL, contendo 300 µL de isopropanol e misturou-se. Logo após, centrifugou-se a amostra por 1 minuto a 13.000 g, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 300 µL de álcool 70%, centrifugou-se novamente por 1 minuto a 13.000 g. Aspirou-se o álcool e a amostra foi deixada ao ar livre por 15 minutos. Para reidratar o DNA, foi utilizado 100 µL da Solução de Reidratação e armazenado a 4°C *overnight*.

4.4. Oligonucleotídeos e reação de PCR

4.4.1. Identificação do tipo viral

Para identificação do tipo viral do BPV, utilizou-se conjuntos de oligonucleotídeos desenhados para amplificar genes específicos de cada tipo viral (Tabela 1):

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na identificação do BPV

Tipo viral	Oligonucleotídeos		Tamanho esperado do fragmento (pb)	Número de acesso – BLASTn
BPV 1*	F	CACACCACTCCGAACAG	523	X02346.1
	R	AGAGGCAATACTGCGG		
BPV 2*	F	TGGAAACGCATTGTC	262	M20219.1
	R	GGGTGGTATAACATACT		
BPV 3*	F	GACCAACAACAGGGCC	192	AF486184.1
	R	GGA CTGCGTAGTACGG		
BPV 4*	F	GCAGGCACACCTAAAGGCTG	505	X05817.1
	R	GCAGGCACACCTAAAGGCTG		
BPV 5*	F	GTGCCAAATGGACAGGATATGTGC	367	AF457465.1
	R	GAGACTGACTTACCAAGCCTG		
BPV 6*	F	GAAGTTGACTGTCCTGCACC	390	AJ620208.1
	R	CGAATGTGCTCTTGGACGGC		
BPV 7*	F	GGTTCGTGGTATTTGGATGTGG	354	DQ217793.1
	R	CGTGGACGAAACCGACCC		
BPV 8*	F	GCCGCACCGCTGAAGG	493	DQ098913.1
	R	AGTCACTCCACTTGCTCCTCC		
BPV 9*	F	CAGGGCTGCTATGTATGGGG	334	AB331650.1
	R	CGCCTGTACCATCTATTGCTG		
BPV 10*	F	CTTAGCTCTGATGAATCC	591	AB331651.1
	R	TACTGGTCAAAATATTGCC		
BPV 11*	F	GCAGGTCGGGGGCTGG	322	AB543507.1
	R	CCAGCCCCGACCTGC		
BPV 12*	F	GGTAGCCAGCCTGCAATTAGTG	528	JF834523.1
	R	CAACGAGCTTCTACATTGCCCTG		
BPV 13*	F	GCCCAACCTCTTAAAG	261	JQ798171.1
	R	TGCAGGAATCACATTTC		
BPV 14**	F	GGAACAAACCTCACAATCAC	195	KR868228.1
	R	CCAGTTCTCTAATACTGAGG		

Fonte: *Próprio autor; **Munday et al. 2015.

A reação consistiu em amostras na concentração de 10 ng com volume final de 25 µL. Adicionou-se 2,5 µL de tampão 10X PCR (Free Mg²⁺), 3,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de nucleotídeos (100 mM), 1,0 µL de oligonucleotídeos *forward* (F) (10 µM), 1,0 µL de oligonucleotídeos *reverse* (R) (10 µM), 0,25 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) (LGC Biotecnologia®). A quantidade de DNA incluída na reação foi calculada individualmente, de acordo a concentração de cada amostra. Água deionizada foi utilizada para completar o volume final da reação. Os ciclos de amplificação foram realizados conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Ciclo de amplificação dos oligonucleotídeos do BPV

	BPV – 1, 5, 9, 11 e 12		BPV – 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 13		BPV - 14	
	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
Início	2	96	2	96	2	96
Desnaturação	1	94	1	94	1	94
Anelamento	2	48	2	50	1	55
Extensão	1	72	1	72	2	72
	40 Ciclos		40 Ciclos		35 Ciclos	
Extensão final	7	72	7	72	5	72

4.4.2. Identificação da proteína β -globina bovina

Nas reações de PCR para a identificação da proteína da β -globina de bovinos, utilizou-se um conjunto de oligonucleotídeos específico da proteína. A β -globina foi utilizada para verificar a qualidade do DNA extraído (Freitas et al. 2003). Os oligonucleotídeos utilizados estão na Tabela 3:

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na identificação da proteína β -globina bovina.

Oligonucleotídeos			Tamanho do fragmento (pb)	Número de acesso - BLAST
*β-globina	<i>Forward</i>	AACCTCTTTGTTTACAACCAG	450	X00376.1
	<i>Reverse</i>	CAGATGCTTAACCCACTGAGG		

Fonte: *Freitas et al. 2003.

A reação constituiu em amostras na concentração de 10 ng com 25 μ L de volume final da reação. Adicionou-se 2,5 μ L de tampão 10X PCR (*Free* Mg^{2+}), 3,0 μ L de $MgCl_2$, 0,5 μ L (100 mM), 1,0 μ L de oligonucleotídeos forward (F), 1,0 μ L de oligonucleotídeos reverse (R), 0,25 μ L (5 U/ μ L) da DNA Taq polimerase (LGC Biotecnologia®). A quantidade de DNA utilizada foi de acordo com a concentração de cada amostra. Utilizou-se água deionizada para completar o volume final da reação. Os ciclos de amplificação foram realizados conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros para amplificação dos oligonucleotídeos da β -globina bovina.

	β -globina bovina	
	Tempo	Temperatura (°C)
Início	2 minutos	96°
Desnaturação	1 minuto	94°
Anelamento	2 minutos	55°
Extensão	1 minuto	72°
	40 ciclos	
Extensão final	7 minutos	72°

4.5. Eletroforese em gel de agarose

Após a realização da PCR, fez-se a Eletroforese com 120 V e 100 mA por 60 minutos. Utilizou-se agarose Sigma-Aldrich e os géis foram preparados na concentração de 2%, dissolvidos em TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X. Para aplicação do PCR no gel foi utilizado tampão de amostra glicerol 50%, azul de bromofenol 0,2% e água deionizada como solvente, bem como o marcador de peso molecular de 100 pares de bases *Low Ladder*® (Sigma-Aldrich). Para visualizar as bandas no gel foi utilizado brometo de etídeo na concentração de 0,5 µg/mL. A visualização das bandas foi feita em luz UV, no fotodocumentador Gel Doc XR+System da BioRad.

4.6. Sequenciamento

Algumas amostras biológicas amplificadas por oligonucleotídeos específicos para cada um dos 14 tipos virais foram sequenciadas com a finalidade de confirmar os resultados obtidos e a acurácia dos oligonucleotídeos. Os sequenciamentos foram realizados pela empresa Ludwing Biotecnologia, localizada na cidade de Alvorada – RS.

As reações de sequenciamento seguiram o seguinte protocolo: 2 µL do produto de PCR, 1 µL do “primer” a 2,5 pM, 2 µL de tampão "save money" (Tris-HCl 1 M pH 9,0 (2

mL); MgCl₂ 50 mM (1 mL); água bidestilada 10 mL), 1 µL do kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing (Pharmacia Biotech, EUA). O sequenciamento foi realizado em termociclador GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems) e pelo sequenciador de DNA ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer™ (Applied Biosystems), seguindo o programa: 35 ciclos de 96°C durante 1 minuto e 60°C por 1 minuto.

A etapa de precipitação do DNA ocorreu da seguinte maneira: 40 µL de isopropanol a 65% foram adicionados aos 10 µL de reação. A mistura foi homogeneizada no vortex por 30 segundos. Deixou-se que a precipitação ocorresse à temperatura ambiente por 20 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas a 1000 rpm (força de centrifugação relativa) por 45 minutos e o sobrenadante descartado. Ao precipitado, foram adicionados 250 µL de etanol 60%, para lavagem do material, e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos. O processo de lavagem com álcool foi repetido utilizando 100 µL do mesmo e, o sobrenadante, descartado. A placa contendo as amostras foi centrifugada de maneira invertida a 500 rpm por um minuto para garantir que todo o álcool fosse retirado da mesma. Uma secagem complementar foi realizada, deixando-se a placa por aproximadamente 10 minutos na capela de fluxo laminar. Este material foi ressuspensão em 10 µL de formamida, desnaturado a 95°C por cinco minutos e levado ao sequenciador.

4.7. Análise da sequência nucleotídica

Os resultados dos sequenciamentos foram analisados por meio do *software* BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9.0 (Ibis Therapeutics Carlsbad, CA, EUA) As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas, utilizando o banco de dados do *National Center of Biotechnology* - NCBI - (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) com a ferramenta BLASTn e BLASTx.

As análises no banco de dados do NCBI foram realizadas com o intuito de observar as regiões em que há similaridades entre as sequências. As ferramentas BLASTn e BLASTx compararam sequências de nucleotídeos com aquelas já depositadas em seu banco de dados e calculam a significância estatística dos resultados.

4.8. Análise filogenética

As sequências foram alinhadas com nucleotídeos homólogos não redundantes obtidos a partir do Banco de dados “*GenBank*”. Foram escolhidas sequências onde os valores de probabilidade eram abaixo de ($Evalue^{-22}$). Relações filogenéticas das sequências nucleotídica parciais dos tipos virais encontrados neste estudo foram realizadas. Árvores filogenéticas foram construídas através do programa Neighbour-joining, método desenvolvido por Saitou e Nei (1987). Uma posterior análise de bootstrap foi realizada para testar a confiabilidade da árvore (Felsenstein, 1985).

As árvores foram construídas por alinhamentos múltiplos da sequência usando o programa ClustalX (Thompson et al. 1997). Todas as sequências de aminoácidos foram comparadas usando o software de exibição de árvore. O tamanho dos ramos foi estimado com 100 repetições bootstrapped e o percentual de vezes em todas as espécies aparecem indicados como um grupo monofilético.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

Foram extraídas 25 amostras de tecido (papilomas) e cinco de sangue de nove diferentes bovinos com papilomatose. O gene da β -globina bovina foi utilizado como parâmetro para avaliar a reação e a qualidade do DNA extraído (Freitas et al. 2003; Freitas et al. 2007) e foi identificada em cinco amostras (animal 2, 3, 4, 6 e 8) de papilomas cutâneos de diferentes bovinos (Figura 6).

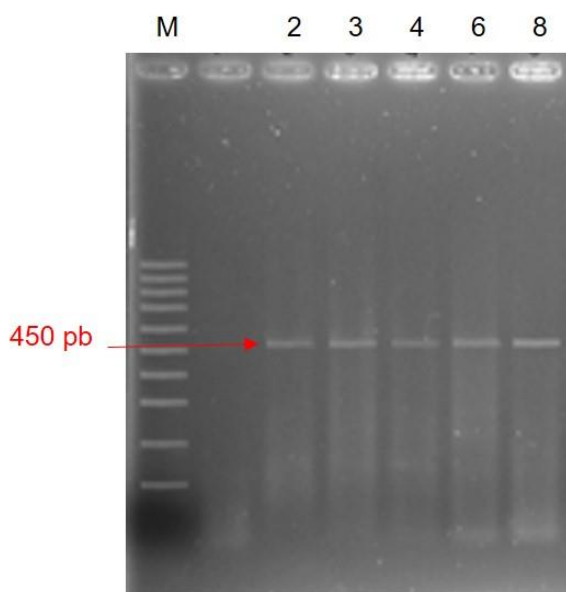


Figura 6. Controle da extração: β -globina bovina.

Dentre as amostras de DNA extraído, 55,5% (5/9) das amostras amplificaram o gene da β -globina bovina. Os resultados encontrados nesse estudo são similares aos achados de Monteiro e colaboradores (2008b), que avaliaram a amplificação desse gene que em 61% das amostras (22/36) de papilomas cutâneos que foram positivas para BPV – 2.

Para a identificação viral de um total de 30 amostras, obteve-se amplificação em cinco animais. Não houve sucesso na amplificação de nenhuma das cinco amostras de sangue. Na tabela 3 estão as informações a respeito da origem das amostras, a concentração do DNA extraído e o sucesso de amplificação do tipo viral.

Tabela 3. Demonstração dos resultados de PCR nas amostras coletadas de bovinos com papilomatose.

Animal	Idade (meses)	Sexo	Localização do papiloma	BPV														Quantidade de DNA (ng/µl)
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	18	F	Pescoço	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	75,8
2	15	F	Úbere	●	-	-	-	●	-	-	-	-	-	-	●	-	-	215,4
3	20	F	Abdômen	-	-	-	-	●	-	-	-	-	-	-	●	-	-	63,6
4	8	M	Dorso	-	-	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-	-	-	294,7
5	9	M	Barbela	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	220,3
6	12	F	Barbela	●	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	402,8
7	24	F	Abdômen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	91,3
8	15	F	Pescoço	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	147,8
9	24	M	Pescoço	●	-	-	-	-	-	-	-	-	●	-	-	●	●	117,8

- amostra testada e não amplificada. ● Amostra positiva para o tipo viral correspondente.

A tipagem por meio da reação de PCR revelou a presença do BPV-1 em 60% (3/5) das amostras, BPV-5 em 40% (2/5), BPV-9 em 20% (1/5), BPV-10 em 20% (1/5), BPV-12 em 40% (2/5), BPV-13 e BPV-14 cada uma com 20% (1/5), resultando na presença de 7 diferentes tipos de BPV, todos agentes de lesões epiteliais.

O BPV – 1 é encontrado tanto no epitélio cutâneo e mucoso, quanto também em fluídos corporais (Lindsey et al. 2009). O BPV-13 é uma importante causa de papilomas epiteliais e um dos principais agentes de sarcomas em equinos (Lunardi et al. 2013; Pang et al. 2014). O BPV-14, por sua vez, está relacionado a lesões neoplásicas cutâneas e sarcóides de felinos e possivelmente também possa estar associado a neoplasias de bexiga, como os outros *Deltapapillomavírus* (BPV-1, BPV-2, BPV-13 e BPV-14) (Roperto et al. 2016). O BPV-5 pode infectar toda a superfície corporal do animal (Campo 2006). O BPV-9, BPV-10, e BPV-12 são todos do gênero *Xipapillomavírus* (Hamata et al. 2011, Zhu et al. 2014), descritos como causadores de lesões epiteliais, confirmando, assim, as lesões identificadas nesse estudo.

Das 25 amostras de tecido (papilomas) que foram extraídos DNA, cinco delas foram positivas para algum tipo viral (figura 7).

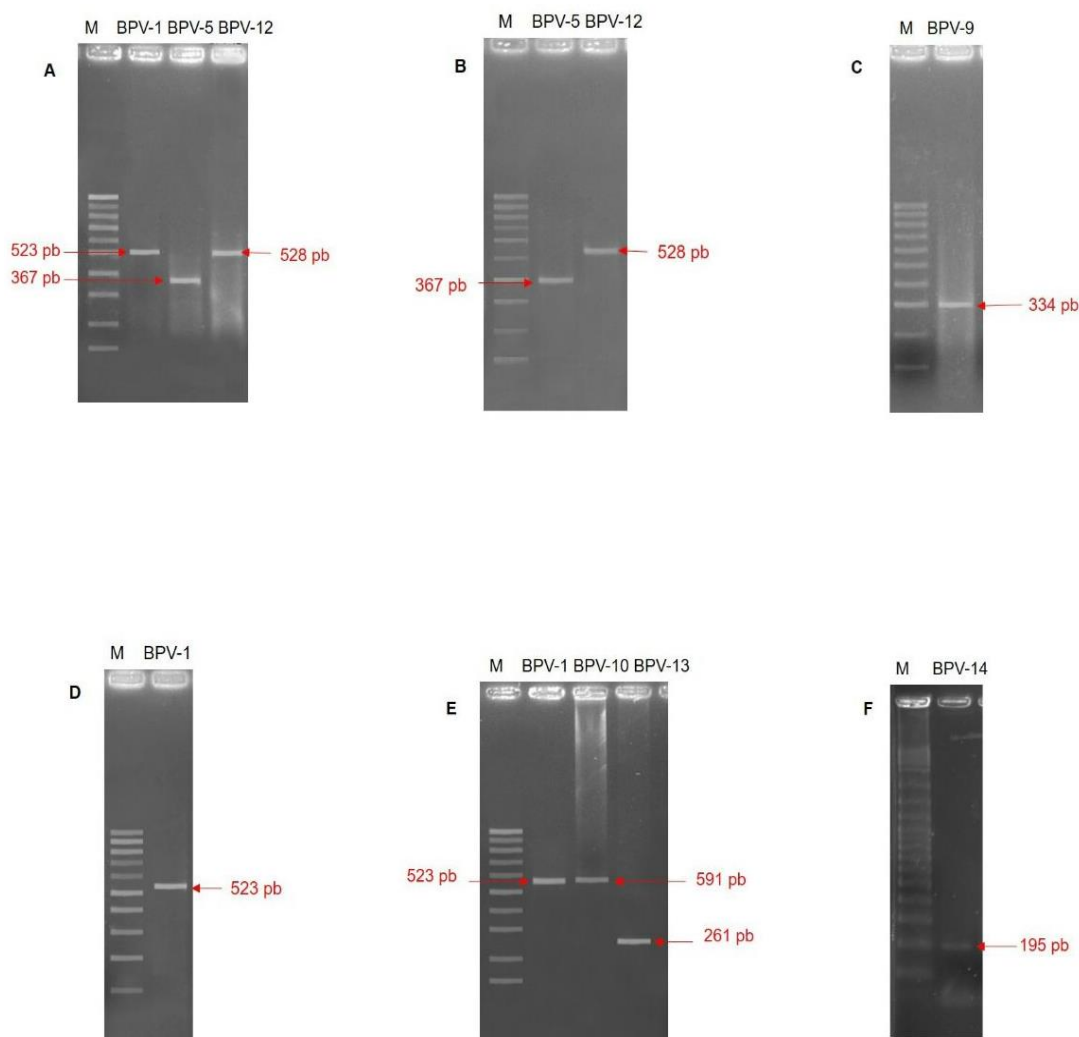


Figura 7. Tipagem viral das amostras de BPV. A. Animal 2, positiva para o BPV-1, BPV-5 e BPV-12; **B. Animal 3**, positiva para o tipo BPV-5 e BPV-12; **C. Animal 4**, positiva para o BPV-9; **D. Animal 6**, positiva para o BPV-1; **E e F** pertencem ao **animal 9**, positiva para BPV-1, BPV-10, BPV-13 e BPV-14.

A presença de mais de um tipo viral infectando a mesma lesão foi verificada em três amostras amplificadas: a primeira foi identificada os tipos BPV - 1, 5 e 12; a segunda, os tipos BPV - 5 e 12 e na terceira os tipos BPV – 1, 10, 13 e 14, totalizando 60% (3/5) de coinfeção (Tabela 4). Esses achados corroboram com os da literatura que demonstram uma alta frequência de lesões papilomatosas causadas por mais de um tipo viral.

Nos estudos de Carvalho e colaboradores (2012), com uma amostragem de 72 lesões, foi possível detectar 89% de papilomas coinfectados, principalmente com os tipos BPV-2 e BPV-3. Já na pesquisa de Santos e colaboradores (2014) que avaliaram 57

amostras de sangue, todas possuíam coinfeção com dois ou mais tipos virais. Batista e colaboradores (2013) analisaram um total de 72 bovinos dos estados da Bahia e Pernambuco e constataram a presença de coinfeção na maioria das amostras avaliadas (89%), ainda concluíram a impossibilidade de se obter um padrão do tipo de PV com a região geográfica, faixa etária ou sexo do animal. Claus e colaboradores (2009) relatam que a ocorrência de infecções múltiplas não gera imunidade cruzada de um tipo viral para o outro e propõem que o tratamento para papilomatose bovina demande um amplo espectro de cobertura para ser melhor efetivo.

Todas as amostras de papilomas foram coletadas de maneira aleatória. Contudo, de acordo com Monteiro et. al. (2008a), as áreas mais acometidas pela papilomatose são aquelas de intenso fluxo sanguíneo e as mais facilmente traumatizadas, em decorrência de atritos com cochos, cercas, cordas, mourões, fato que favorece a proliferação e transmissão do vírus.

Tabela 4. Tipos virais identificados nos papilomas bovinos.

Animal	β-globina	Tipo viral	Localização do papiloma
2	+	BPV – 1, BPV, 5, BPV – 12	Úbere
3	+	BPV - 5, BPV - 12	Abdômen lateral
4	+	BPV - 9	Dorso
6	+	BPV – 1	Barbela
8	+	-	Pescoço
9	-	BPV-1, BPV - 10, BPV – 13, BPV - 14	Pescoço

Após a amplificação, uma amostra de cada tipo viral foi submetida á reação de sequenciamento para a validação dos iniciadores específicos utilizados na identificação dos diferentes tipos de BPV. As sequências foram analisadas com ferramentas de bioinformática e comparadas com outras sequências nucleotídica depositas na base de dados do *GenBank*.

O alinhamento validou as sequências nucleotídicas com a identidade variando entre 95% a 74%. Assim, o BPV – 1 demonstrou identidade em 80% para o BPV-1 e BPV – 4. O BPV – 5 apresentou 95% de identidade para o tipo 5 do vírus. O BPV – 14 apresentou 95% de identidade com o genoma viral do tipo 14 (Figura 8).

A						B					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand		Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
479 bits(530)	4e-131	399/497(80%)	5/497(1%)	Plus/Plus		484 bits(536)	1e-132	400/497(80%)	5/497(1%)	Plus/Plus	
Query 17	AGGATCKAGTGTCTTAKY-CTCGKCCCTACTCGGTATGGGTGCRGGCATTCTTT-GR	74				Query 17	AGGATCKAGTGTCTTAKY-CTCGKCCCTACTCGGTATGGGTGCRGGCATTCTTT-GR	74			
Sbjct 4449	AGGATCCAGAGCTGTAAACAGCAGGGACCCGCCAGTATAGGTGCGGGCATTCTTTTABA	4508				Sbjct 4399	AGGATCCAGAGCTGTAAACAGCAGGGACCCGCCAGTATAGGTGCGGGCATTCTTTTABA	4458			
Query 75	CAKGCCKTGAACCTCTTGGTACCTTGGCTCGTGGGTGGATGAAGTCACTGAGTACCT	134				Query 75	CAKGCCKTGAACCTCTTGGTACCTTGGCTCGTGGGTGGATGAAGTCACTGAGTACCT	134			
Sbjct 4509	CAC-CTTGAAACTCTTGGGGCTTGGCTCCAGGGGTGTATGAGGACACTGTGCTACCA	4567				Sbjct 4459	CAC-CTTGAAACTCTTGGGGCTTGGCTCCAGGGGTGTATGAGGACACTGTGCTACCA	4517			
Query 135	AGGAYTTTGCATATATACACCTGATGCAATTCTGTGAGATTACAGGCTTGTATGCCCTGT	194				Query 135	AGGAYTTTGCATATATACACCTGATGCAATTCTGTGAGATTACAGGCTTGTATGCCCTGT	194			
Sbjct 4568	AGGCCCTTGCATATGCTCACTCTGATGCTGTCTTGTGAGATTACAGGCTTGTATGCCCTGT	4627				Sbjct 4518	AGGCCCTTGCATATGCTCACTCTGATGCTGTCTTGTGAGATTACAGGCTTGTATGCCCTGT	4577			
Query 195	CCATAAGTCCGGACTCGTGTGGAGACCCCTCATTACTCTATTGAGCTGATGTCCTCG	254				Query 195	CCATAAGTCCGGACTCGTGTGGAGACCCCTCATTACTCTATTGAGCTGATGTCCTCG	254			
Sbjct 4628	CCATAGGTACAGACTGTCCACGGAGACCTCTATTACTTGTCTAGAGCTGAGGGTCCCG	4687				Sbjct 4578	CCATAGGTACAGACTGTCCACGGAGACCTCTATTACTTGTCTAGAGCTGAGGGTCCCG	4637			
Query 255	AGAACATATCGGATCATGRKCTGCTATCCCTGTTTCTCTAAKATGTATAGTAAGAACTG	314				Query 255	AGAACATATCGGATCATGRKCTGCTATCCCTGTTTCTCTAAKATGTATAGTAAGAACTG	314			
Sbjct 4688	AGGACATAGCGGTCTTGGAGCTGCAACCCCTGGACCTGCAACTTGGCAAGTAAGCAATG	4747				Sbjct 4638	AGGACATAGCGGTCTTGGAGCTGCAACCCCTGGACCTGCAACTTGGCAAGTAAGCAATG	4697			
Query 315	CTTTTCATCAGACCTCTGCTACCAACCCCTTTTCAGCTGCAATCTCCATTGCAAAAA	374				Query 315	CTTTTCATCAGACCTCTGCTACCAACCCCTTTTCAGCTGCAATCTCCATTGCAAAAA	374			
Sbjct 4748	CTGTCATCAGTCTCTGCTATACACGCCCTCTGCACTGCAATCTCCATTGCAAAAA	4807				Sbjct 4698	CTGTCATCAGTCTCTGCTATACACGCCCTCTGCACTGCAATCTCCATTGCAAAAA	4757			
Query 375	CATCTGTTTGAATAATATTTTGTAGKAGCTCGGGTTTARGGGATACCKGASGAGAAA	434				Query 375	CATCTGTTTGAATAATATTTTGTAGKAGCTCGGGTTTARGGGATACCKGASGAGAAA	434			
Sbjct 4808	CATCTGTTTGAATAATATTTTGTAGGAGCTCGGGTTTARGGGATACAGGAGGAGAAA	4867				Sbjct 4758	CATCTGTTTGAATAATATTTTGTAGGAGCTCGGGTTTARGGGATACAGGAGGAGAAA	4817			
Query 435	ACATTGAATGACRTACTTCSGGTCCCAACCAACCAACCCCGCAGTATTGCCVCSG	494				Query 435	ACATTGAATGACRTACTTCSGGTCCCAACCAACCAACCCCGCAGTATTGCCVCSG	494			
Sbjct 4868	ACATTGAATGACRTACTTCSGGTCCCAACCAACCAACCCCGCAGTATTGCCVCSG	4925				Sbjct 4818	ACATTGAATGACRTACTTCSGGTCCCAACCAACCAACCCCGCAGTATTGCCVCSG	4875			

C						D					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand		Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
448 bits(496)	4e-122	263/279(94%)	0/279(0%)	Plus/Plus		228 bits(252)	3e-56	135/142(95%)	0/142(0%)	Plus/Plus	
Query 66	AAGCAGCTTCACTAATCTTTTCCATCTTGAAGCACTCAAAAAGGCCCTTTTAACTG	125				Query 26	TGWCATGCTCAGTTTAAATGATATACAGACATGTAGAGGAATATAAGTACCTTTTAT	85			
Sbjct 1129	AAGCAGCATACTAATCTTTTCACTACTTGAAGCACTCAAAAAGGCCCTTTTAACTG	1870				Sbjct 6665	TGACACAGCTCAGTTTAAATGATATACAGACATGTAGAGGAATATAAGTACCTTTTAT	6724			
Query 126	ATGGGGTGTGTGGTTCACAGGCTGCACACTGCTACCAACCTGTCACCTCTACTCG	185				Query 86	ATTGCAGCTGTGTGAGTAAAGTATACAGACATGTAGAGGAATATAAGTACCTTTTAT	145			
Sbjct 1069	CTGGGGTGTGTGGTTCACAGGCTGCACACTGCTACCAACCTGTCACCTCTACTCG	1810				Sbjct 6725	ATTGCAGCTTTGTGAGTAAAGTATACAGACATGTAGAGGAATATAAGTACCTTTTAT	6784			
Query 186	ACTCRAGGTGCAATTTCTTTTGAAGTATTTACTTTCTGTTTCCGCTGGGCTACCT	245				Query 146	GCCCTCAGTATTAGAGAACTGG 167				
Sbjct 1009	ACTCRAGGTGCAATTTCTTTTGAAGTATTTACTTTCTGTTTCCGCTGGGCTACCT	950				Sbjct 6785	TCCCTCAGTATTAGAGAACTGG 6806				
Query 246	GGCTCTGGAAGGGGCAAGGATTTCCCTGTGCTAAAGGCGCATTTGTCTATAAATCAG	305									
Sbjct 949	GGCTCTGGAAGGGGCAAGGATTTCCCTGTGCTAAAGGCGCATTTGTCTATAAATCAG	890									
Query 306	CATCGAAGCTATTGACATATCTGTCATTGTGGACAT 344										
Sbjct 889	CATCGAAGCTATTGACATATCTGTCATTGTGGACAT 851										

Figura 8. Trechos dos alinhamentos. A e B – correspondem ao BPV-1 e BPV-4, ambos com identidade de 80%; **C** – corresponde ao BPV-5 com identidade de 95%; **D** – corresponde ao BPV-14, com 95% de identidade.

O BPV – 9 divergiu, apresentando identidade com o BPV - 13 em 79% e com BPV - 2 em 74%. Isso pode ter ocorrido devido ao sequenciamento ter sido feito só com parte da molécula. Caso o sequenciamento tivesse sido com toda a sequência nucleotídica, poderia ter apresentado similaridade com o tipo viral encontrado no PCR convencional (Tabela 5). O BPV-10 e BPV-12 não obtiveram êxito no sequenciamento, sendo necessário novo sequenciamento.

Tabela 5. Dados de identidade, similaridade e número de acesso do BLASTn, relacionados as sequências nucleotídica amplificadas para cada tipo viral.

Alinhamento	Descrição	Identidade	Número de acesso - BLASTn
BPV 1	BPV 1	80%	X02346.1
	BPV 4	80%	FJ816109.1
	BPV 5	95%	AF457465.1
BPV 5	BPV 5	94%	AF457465.1
	BPV 8	88%	DQ098913.1
BPV 9	BPV 13	79%	JQ798171.1
	BPV 2	74%	KC878306.1
BPV 14	BPV 14	95%	KR868228.1
	BPV 14	91%	KP276343.1

Também fez-se o alinhamento das sequências nucleotídicas com sequências deduzidas de aminoácidos relacionadas com a região do gene que amplificaram (Tabela 6). Como resultado, os iniciadores para identificação do BPV-1 anelam com 64% de identidade com o gene codificante para a proteína do capsídeo viral L2 do tipo 1 do vírus. Os oligonucleotídeos do BPV-5 amplificam com 90% da sequência deduzida de proteínas, com identidade para proteína E1 dos PV. Os oligonucleotídeos para amplificação do BPV-9 anelam na região codificante da proteína L2 do BPV-2 e BPV-13, ambas com 69% de identidade, fato já discutido anteriormente. Já os iniciadores do BPV-14 amplificam regiões codificante para a proteína L1 com 98% de identidade.

Tabela 6. Dados de identidade, similaridade e número de acesso das sequências deduzidas de proteínas relacionadas às sequências nucleotídicas amplificadas para cada tipo viral.

Alinhamento	Descrição	Identidade	Número de acesso - BLASTx
BPV 1	L2 BPV-1	64%	AFV52375.1
	L2 BPV-2	57%	AMZ04147.1
	L2 BPV-1	89%	NP 056743.1
BPV 5	E1	90%	AMZ04151.1
	E1	75%	NP 694432.1
	E1	88%	AMZ04151.1
BPV 9	L2 BPV 13	69%	AFR76818.1
	L2 BPV 2	66%	AMZ04147.1
BPV 14	L1 BPV-14	98%	AKB94042.1
	L1 Associado a papilomas em felinos	96%	ACS91339.1

Silva e colaboradores (2013), constataram que o uso dos iniciadores específicos para a identificação do BPV são mais sensíveis na detecção viral do que os iniciadores consenso (FAP59/FAP64 e MY09/MY11 (Antonsson, Hansson 2002). Na presente pesquisa a escolha por oligonucleotídeos específicos para a tipificação viral visou uma identificação viral mais precisa, com o anelamento do gene-alvo (Vicari 2011).

Realizou-se também a filogenia entre os tipos virais sequenciados, para a análise filogenética, utilizou-se o programa CLUSTALW e foi observado que o tipo 14 (BPV-14), 5F (BPV-9) e 1 (BPV-1) estão próximos filogeneticamente, conforme valores de bootstrap. O tipo viral 9 (BPV-9) se agrupou em ramo separado, dessa forma, esse tipo viral é considerado distante filogeneticamente (Figura 9).

A similaridade ou diferença verificada na filogenia pode ser atribuída a classificação em gênero dos respectivos tipos virais. Os tipos virais 1 e 14 pertencem ao

mesmo gênero, o *Deltapapillomavirus*. O diagrama filogenético demonstrou baixa aproximação genética, entre as sequências nucleotídicas dos tipos virais 5, 9 e 14, os papilomavírus dos tipos 5 e 9 pertencem a gêneros diferentes, *Epsilonpapillomavirus* e *Xipapillomavirus*, respectivamente, justifica-se dessa forma, a distância filogenética entre esses tipos virais, verificada no diagrama (De Villiers et al. 2004).

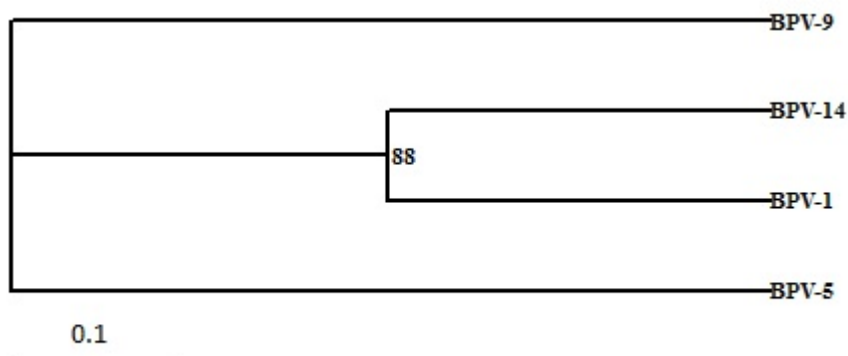


Figura 9. Histograma da sequência nucleotídica parcial de cada tipo viral encontrado neste estudo.
BPV1- tipo viral 1; BPV5- tipo viral 5; BPV9- tipo viral 9; BPV14- tipo viral 14

Os dados de filogenia molecular reforçam a ideia de que determinados tipos virais são bastante diferentes entre eles. As evidências de distanciamento nucleotídico entre os tipos virais sugere que pode ter havido mutações que induziram diversidade molecular com capacidade de originar 14 tipos virais. Contudo, cabe ressaltar que embora ocorra esse distanciamento no genoma, a ORF L1 possui distribuição semelhante em todos os papilomas vírus (De Villiers et al. 2004).

6. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram a ocorrência de sete tipos virais presentes nos bovinos analisados (BPV-1, 5, 9, 10, 12, 13 e 14), com o BPV-1 mais prevalente, presente em 60% das amostras amplificadas. As coinfeções foram verificadas em 60% das amostras com até quatro tipos virais na mesma lesão, demonstrando um alto grau adaptação do vírus ao seu hospedeiro.

O sequenciamento parcial validou os oligonucleotídeos utilizados para a identificação do BPV-1, BPV-5 e BPV-14, pois apresentaram uma identidade variando de 74% a 95%. Apenas as sequências do BPV-9 não puderam ser validadas, necessitando de um sequenciamento mais amplo. Com exceção do alinhamento da amostra relacionada ao BPV-9, os alinhamentos para a análise das proteínas relacionadas as sequências nucleotídicas demonstraram a região de anelamento de cada sequência, certificando os resultados dos sequenciamentos com os genes pertencentes ao seu respectivo tipo viral.

A análise filogenética demonstrou similaridade entre os tipos virais pertencentes ao mesmo gênero, fato já esperado pelas semelhanças genômicas presentes em cada um desses grupos. Vale ressaltar que a análise das amostras 9F e 9F, relacionadas ao BPV-9, ainda não está fidedigno, necessitando nova análise.

No geral, houve um baixo rendimento na amplificação dos quatorze conjuntos de oligonucleotídeos. Isso pode ter ocorrido devido há vários fatores como, por exemplo, a baixa qualidade do DNA extraído, pois a reação de PCR, apesar de ser um método sensível e específico que possibilita a amplificação de um baixo número de cópias virais, pode ser afetada por fatores como a ciclagem, a concentração de magnésio, o pH, os dNTPS e a integridade das amostras (Garland, Tabrizi 2006). A escolha de um único método pode ter subestimado a verdadeira presença do vírus. A escolha de outro método mais acurado como, como a PCR quantitativa em tempo real poderia aumentar a sensibilidade na detecção e quantificação da carga viral quando comparado com a PCR.

REFERÊNCIAS

1. Antonsson A, Hansson BG. Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *Journal of Virology*, v. 76, n. 24, p. 12537-12542, 2002.
2. Batista MVA. Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. *The Veterinary Journal*, v.197, p. 368-373, 2013.
3. Bergvall M, Melendy T, Archambault J. The E1 proteins. *Virology*, v. 445, n. 1, p. 35-56, 2013.
4. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *International journal of cancer*, v. 118, n. 5, p. 1071-1076, 2006.
5. Bernard HU, et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010.
6. Bocaneti F, et al. Bovine papillomavirus: new insights into an old disease. *Transboundary and emerging diseases*, 2014.
7. Borzacchiello G, Roperto F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary research*, v. 39, n. 5, p. 1, 2008.
8. Borzacchiello G. Bovine papillomavirus infections in animals. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, v. 2, 2007.
9. Buck C B, et al. Maturation of papillomavirus capsids. *Journal of virology*, v. 79, n. 5, p. 2839-2846, 2005.

10. Campo M. Saveria. Bovine papillomavirus: old system, new lessons. *Papillomavirus research: From natural history to vaccines and beyond*, p. 373-387, 2006.
11. Campos SRC, et al. Chromosome aberrations in cells infected with bovine papillomavirus: comparing cutaneous papilloma, esophagus papilloma, and urinary bladder lesion cells. *ISRN oncology*, v. 2013, 2013.
12. Carvalho C, et al. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 82-84, 2003.
13. Carvalho CCR, et al. Detection of Bovine Papillomavirus Types, Co-Infection and a Putative New BPV11 Subtype in Cattle. *Transboundary and emerging diseases*, v. 59, n. 5, p. 441-447, 2012.
14. Carvalho MCCG, Silva DCG. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. *Ciência Rural*. V. v.40, n.3, p. 735-744, 2010.
15. Catroxo MHB, et al. Ultrastructural Study of Bovine Papillomavirus During Outbreaks in Brazil. *International Journal of Morphology*, v. 31, n. 2, 2013.
16. Claus MP, et al. Análise filogenética de papilomavírus bovino associado com lesões cutâneas em rebanhos do Estado do P lesões cutâneas em rebanhos do Estado do Paraná¹. *Pesq. Vet. Bras*, v. 27, n. 7, p. 314-318, 2007.
17. Claus MP, et al. Multiple bovine papillomavirus infections associated with cutaneous papillomatosis in Brazilian cattle herds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. SPE, p. 93-98, 2009.
18. Cota, João B. et al. Detection and quantification of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladders and lymph nodes in cases of Bovine Enzootic Hematuria from the endemic region of Azores. *Veterinary microbiology*, v. 178, n. 1, p. 138-143, 2015.

19. Da Silva LAF, et al. Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamentos para papilomatose bovina. *Revista da FZVA*, v. 11, n. 1, 2004.
20. Dantas CCO, Silva LCRP, Negrão FM. Manejo sanitário de doenças do gado leiteiro. *PUBVET*, v. 4, n. 32, 2010.
21. Day PM, Schiller JT. The role of furin in papillomavirus infection. *Future microbiology*, v. 4, n. 10, p. 1255-1262, 2009.
22. De Villiers EM, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.
23. Dias JDC, et al. Detecção do papilomavírus bovino tipo 2 em bexigas de bovinos com Hematúria Enzoótica pela técnica de reação em cadeia de polimerase no sul do Espírito Santo, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 34, p. 146-151, 2012.
24. Doorbar J, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, v. 30, p. F55-F70, 2012.
25. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science*, v. 110, n. 5, p. 525-541, 2006.
26. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology*, v. 32, p. 7-15, 2005.
27. Doorbar, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, v. 445, n. 1, p. 80-98, 2013.
28. Felsenstein, Joseph. Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*, v. 125, n. 1, p. 1-15, 1985.

29. Finlay M, et al. The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. *Virus research*, v. 144, n. 1, p. 315-317, 2009.
30. Freitas AC, et al. Papillomavirus DNA detection in non epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus. *Pathogenesis*, v. 11, p. 12, 2007.
31. Freitas AC, et al. Recent insights into Bovine Papillomavirus. *African Journal of Microbiology Research*, v. 5, n. 33, p. 6004-6012, 2011.
32. Freitas AC, et al. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Brazilian journal of microbiology*, v. 34, p. 76-78, 2003.
33. Garland SM, Tabrizi S. Methods for HPV Detection: Polymerase Chain Reaction Assays. Emerging Issues on HPV Infections: In: **Emerging Issues on HPV Infections**. Karger Publishers, p. 63-72, 2006.
34. Hama C, Matsumoto T, Franceschini PH. Papilomatose bovina: Avaliação clínica de diferentes produtos utilizados no controle e tratamento. *Ciência Vet*, v. 2, n. 2, p. 14-15, 1988.
35. Hartl B, et al. Inoculation of young horses with bovine papillomavirus type 1 virions leads to early infection of PBMCs prior to pseudo-sarcoid formation. *Journal of General Virology*, v. 92, n. 10, p. 2437-2445, 2011.
36. Hatama S, et al. Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. *Archives of virology*, v. 156, n. 7, p. 1281-1285, 2011.
37. Hatama S, Nobumoto K, Kanno, T. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *Journal of General Virology*, v. 89, n. 1, p. 158-163, 2008.

38. Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, v. 384, n. 2, p. 324-334, 2009.
39. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:
<<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias.html?view=noticia&id=1&idnoticia=3268&busca=1&t=ppm-rebanho-bovino-alcanca-marca-recorde-215-2-milhoes-cabecas-producao-leite>> Acesso em: 21 de abril de 2017.
40. ICTV. *International Committee on Taxonomy of Viruses*. Disponível em:
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=20142720>. Acesso em: 13 de março 2016.
41. Joya P, et al. Infectious agents affecting fertility of bulls, and transmission risk through semen: Retrospective analysis of their sanitary status in Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v. 24, n. 4, p. 623-633, 2011.
42. Leto MGP, et al. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 86, n. 2, p. 306-317, 2011.
43. Lindholm I. et al. Papillomas of the teats and udder of cattle and their causal viruses. *The Veterinary record*, v. 115, n. 22, p. 574-577, 1984.
44. Lindsey CJ. et al. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genetics and Molecular Research*, v. 8, n. 1, p. 310-318, 2009.
45. Lunardi M, et al. Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids. *Journal of clinical microbiology*, v. 51, n. 7, p. 2167-2171, 2013.

46. Maglennon GA, McIntosh P, Doorbar J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. *Virology*, v. 414, n. 2, p. 153-163, 2011.
47. MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: 11 de março de 2016.
48. Marchler-Bauer A, et al. Genome acquisition in horizontal gene transfer: symbiogenesis and macromolecular sequence analysis. *Methods Mol Biol.*, v. 532, p. 181-91, 2009.
49. Marins RSQS, et al. Avaliação da eficácia da homeopatia e fitoterapia no tratamento da papilomatose cutânea bovina. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 13, n. 1, 2006.
50. Marins RSQS. *Epidemiologia da Papilomatose Cutânea bovina e avaliação da eficácia de diferentes tratamentos em micro-regiões dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo*. Fluminense [Dissertação de Mestrado em Produção Animal – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro], 2004.
51. McBride AA. et al Hitchhiking on host chromatin: how papillomaviruses persist. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, v. 1819, n. 7, p. 820-825, 2012.
52. McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, v. 445, n. 1, p. 57-79, 2013.
53. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO journal*, v. 21, n. 18, p. 4754-4762, 2002.
54. Monteiro VC, et al. Descrição clínica e histopatológica da papilomatose cutânea bovina (BPV). *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 4, p. 1079-1088, 2008a.

55. Monteiro VLC, et al. Uso da reação em cadeia da polimerase na detecção da papilomatose bovina no Estado de Pernambuco. *Medicina Veterinária*, v. 2, p. 9-15, 2008b.
56. Munday JS. Bovine and Human Papillomaviruses A Comparative Review. *Veterinary pathology*, v. 51, n. 6, p. 1063-1075, 2014.
57. Munday JS. Knight CG. Amplification of feline sarcoid-associated papillomavirus DNA sequences from bovine skin. *Veterinary dermatology*, v. 21, n. 4, p. 341-344, 2010.
58. Muro L, Bottura C, Piccinin A. Papilomatose bovina. *Rev. Cient. Eletôn. Med. Vet*, v. 6, n. 10, 2008.
59. Nasir L, Campo M. Saveria. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Veterinary dermatology*, v. 19, n. 5, p. 243-254, 2008.
60. Ogawa T, et al. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *Journal of general virology*, v. 88, n. 7, p. 1934-1938, 2007.
61. Pang F, et al. Complete genome sequence of bovine papillomavirus genotype 13 from local yellow cattle in Hainan Province, China. *Genome announcements*, v. 2, n. 6, p. e01087-14, 2014.
62. Peres Neto F, Zappa V. Mastite em vacas leiteiras-revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 16, p. 1-28, 2011.
63. Poletto R, et al. Prevalência de tuberculose, brucelose e infecções víricas em bovinos leiteiros do município de Passo Fundo, RS. *Ciênc. rural*, v. 34, n. 2, p. 595-598, 2004.

64. Rector A, Van Ranst M. Animal papillomaviruses. *Virology*, v. 445, n. 1, p. 213-223, 2013.
65. Rinke C, et al. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, v. 499, p.431-437, 2013.
66. Rivoire WA, et al. Molecular biology of cervical cancer. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, v. 6, n. 4, p. 447-451, 2006.
67. Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, v. 445, n. 1, p. 138-168, 2013.
68. Roperto S, et al. Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle. *Veterinary Microbiology*, v. 190, p. 1-4, 2016.
69. Roperto S, et al. Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: possible biological role. *Journal of General Virology*, v. 89, n. 12, p. 3027-3033, 2008.
70. Roperto S, et al. PBMCs are additional sites of productive infection of bovine papillomavirus type 2. *Journal of General Virology*, v. 92, n. 8, p. 1787-1794, 2011.
71. Roperto S, et al. Productive infection of bovine papillomavirus type 2 in the placenta of pregnant cows affected with urinary bladder tumors. *PLoS One*, v. 7, n. 3, p. e33569, 2012.
72. Saitou, N, Nei, Masatoshi. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

73. Santos EUD, et al. Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of Cattle. *Transboundary and emerging diseases*, 2014.
74. Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic oncology*, v. 118, n. 1, p. S12-S17, 2010.
75. Schmitt M, Fiedler V, Müller M. Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPV genotyping assay. *Journal of virological methods*, v. 170, n. 1, p. 67-72, 2010.
76. Silva MAR et al. Comparison of two PCR strategies for the detection of bovine papillomavirus. *Journal of Virological Methods*, v. 192, p.55-58, 2013.
77. Stocco RC. et al. Papilomatose infecta 60% do rebanho bovino. *Veterinária in Foco*, São Paulo, v.1, ed., 09 out., 2003.
78. Thompson, Julie D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research*, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.
79. USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. USDA ERS – Brazil: trade. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/topics/international-markets-trade/countries-regions/brazil/trade.aspx>> Acesso em: 14 de julho, 2015.
80. Van Dyk, E, et al. Detection and characterisation of papillomavirus in skin lesions of giraffe and sable antelope in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 82, n.2, p. 80-85, 2011.
81. Varella RB. et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados. *J Bras Patol Med Lab*, v. 41, n. 4, p. 257-62, 2005.

82. Venuti A. et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular cancer*, v. 10, n. 1, p. 1, 2011.
83. Vicari, CAF. *Avaliação de Métodos para a identificação dos vírus do papiloma bovino*. São Paulo [Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Morfologia – Universidade Federal de São Paulo], 2011.
84. Wang JW, Roden RBS L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, v. 445, n. 1, p. 175-186, 2013.
85. Zanin A, et al. Apuração de Custos e resultado econômico no manejo da produção leiteira: uma análise comparativa entre o sistema tradicional e o sistema freestall. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, v. 17, n. 4, 2015.
86. Zhu W, et al. Bovine papillomavirus type 10 with a deletion associated with a lingual papilloma in a cow. *The Veterinary Journal*, v. 199, n. 2, p. 303-305, 2014.
87. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, n. 5, p. 342-350, 2002.

ANEXOS

Anexo I – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUMA.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiania, 09/02/2015

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA, PROTOCOLADO NESTA COMISSÃO SOB O N. 049/14

I - Finalidade do projeto (pesquisa/ensino): Pesquisa

II - Identificação:

Título do projeto: Uso de fitoterápico no tratamento de papilomatose bovina: eficácia de bioproduto, avaliação imunológica, caracterização viral. N° SAPP 39474.

Pesquisador Responsável/ Unidade: Carla Afonso da Silva Bitencourt Braga

☐ **Pesquisadores Participantes:**

Edmilson Cardoso da Conceição - FF/UFG

Milton Adriano Pelli da Oliveira - EVZ/UFG

José Realino de Paula - FF/UFG

Ana Paula Iglesias Santin - EVZ/UFG

Eugênio Gonçalves de Araújo - EVZ/UFG

☐ **Unidade onde será realizado:** IPSTP e FF da UFG

☐ **Data de apresentação à CEUA:** 26 de junho de 2014

☐ **Data de atendimento da pendência:** 03 de novembro de 2014

III - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, Aproveu o projeto acima referido e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar a CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei n°. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa n°. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em dezembro de 2016.

IV - Data da reunião: 08/12/2014

Assinado de forma digital por
RENATA MAZARO:12343522812
Dados: 2015.02.20 14:54:54
+02'00'

Dra. Renata Mazaro e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) -
CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1163.
Email: ceua.ufg@gmail.com

Anexo II – Imagens de papilomas e extração cirúrgica de lesões papilomatosas.



Figura 10. Papiloma plano e pedunculados. A. Papiloma plano, localizado no abdômen lateral de bovino. B. Papilomas pedunculados, localizados do dorso de bezerro.

Figura 11. Papilomas na região caudal, genital e úbere (detalhe). Papilomas em vaca da raça Girolanda.**Figura 12. Papiloma plano e pedunculados.** A. Papiloma plano, localizado no abdômen lateral de bovino. B. Papilomas pedunculados, localizados do dorso de bezerro.

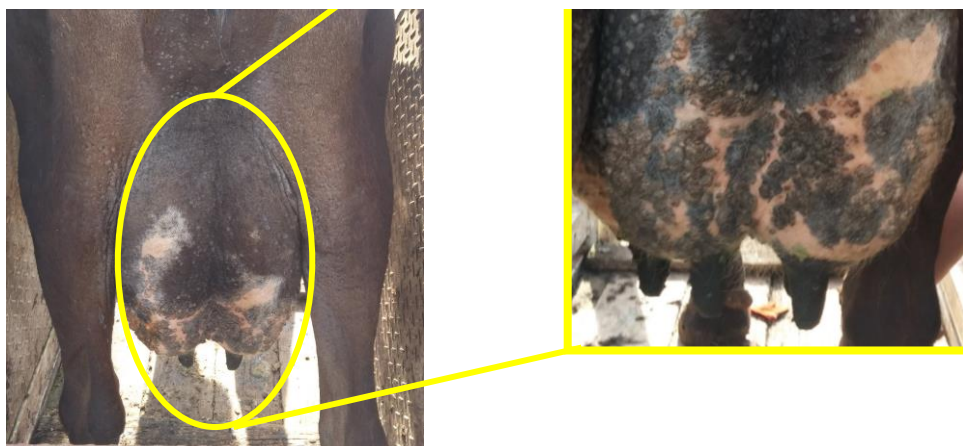


Figura 13. Papilomas na região caudal, genital e úbere (detalhe). Papilomas em vaca da raça Girolanda.

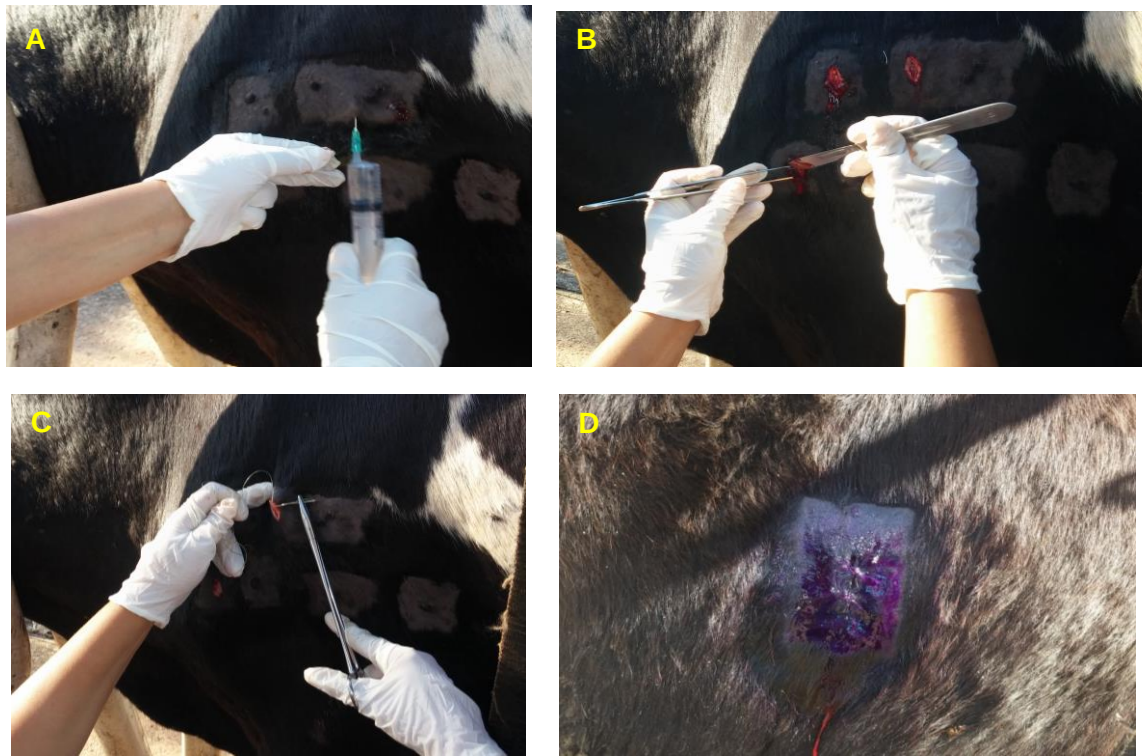


Figura 15. Extração cirúrgica de papilomas. A. Anestesia local subcutânea no abdômen lateral de bovino. B. Extração cirúrgica de papilomas no abdômen lateral de bovinos. C. Sutura em ponto simples separado em lesão cirúrgica para extração de papilomas no abdômen lateral de bovino. D. Lesão cirúrgica suturada com aplicação de repelente/cicatrizante localizada no abdômen lateral de bovino.

Figura 16. Extração cirúrgica de papilomas. A. Anestesia local subcutânea no abdômen lateral de bovino. B. Extração cirúrgica de papilomas no abdômen lateral de bovinos. C. Sutura em ponto simples separado em lesão cirúrgica para extração de papilomas no abdômen lateral de bovino. D. Lesão cirúrgica suturada com aplicação de repelente/cicatrizante localizada no abdômen lateral de bovino.

Anexo III - Resumo da submetido ao XXIII Congresso Latinoamericano de Microbiologia 2016.

Su resumen se encuentra **Finalizado**

0504

Detection and characterization of bovine Papillomavirus in cutaneous papillomas samples

CC Lilian¹, CAA Winnie¹, PG Raylanne¹, AFFS Luiz¹, ER Rogerio², AS Jéssica¹, ASBB Carla¹

1 Universidade Federal de Goiás, Brasil. 2 Universidade Federal de Goiás - Campus Jataí, Brasil

Bovine Papillomavirus (BPV) is the etiologic agent of bovine papillomatosis, infectious disease of worldwide distribution, which generates numerous economic losses to livestock. It is characterized by hyperproliferative lesions (papillomas) in the cutaneous and mucosal epithelia, which tend to regression, but can persist or even progress to neoplasia. Depending on the location of the lesions can occur numerous disorders in cattle, for example, blindness, difficulty/ impossibility of milking or feeding, loss of reproductive function, and serves as a gateway to secondary infections. The BPV viruses are small, circular non-enveloped DNA, which infect the basal cells of the epithelium, usually microlesions. Until now, BPV viruses are divided into four genera: Delta papillomavirus (BPV - 1, 2, 13), Epsilon papillomavirus (BPV - 5, 8), Xipa pillomavirus (BPV - 3, 4, 6, 9, 10, 11, 12) and BPV - 7, which does not have an assigned genera. This study aimed to identify the BPV type in samples of skin papillomas from cattle dairy fitness of the State of Goiás - Brazil. To conduct the study were collected papillomas from nine cattle of Girolando kind, of both sexes and aged between nine and 24 months. Papillomas were processed individually, and each sample had its DNA extracted and subjected to classical PCR, using primers designed for each virus type, with Bovine beta-globin gene was used as a positive control reaction. Of the nine animals that were collected papillomas, was obtained positivity for seven. The typing revealed the presence of BPV - 1 in 57% (4/7) of the samples BPV: type 5 in 57% (4/7), type 9 in 14% (1/7), type 10 in 14% (1/7), type 12 in 28% (2/7), type 13 in 14% (1/7). According to the results, was identified the occurrence of three of four genera bovine papillomavirus in the animals analyzed. It was also verified the occurrence of coinfection in four animals, and in one was detected the BPV-1, 5 and 12 types; in another sample were detected, the BPV-1, 10 and 13 types, in another sample were detected the BPV- 1, 10 and 13; and the fourth sample were found the BPV- 1 and 5 types, totaling 57% of the cattle infected with more than one viral type in the same lesion.

The results showed that about six viral types are present in the state of Goiás, needing therefore perform epidemiological study to detect all kinds of BPV that are present in the state and establish new perspectives for prevention and treatment of injury established by bovine Papillomavirus.