



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SARAH ELIZABETH IZZO CRESPO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE L1 DE UM
PROVÁVEL NOVO TIPO DE *XIPILLOMAVIRUS* BOVINO,
BRASIL**

Londrina
2017

SARAH ELIZABETH IZZO CRESPO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE L1 DE UM
PROVÁVEL NOVO TIPO DE *XIPAPILLOMAVIRUS* BOVINO,
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alice Fernandes Alfieri

Londrina
2017

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

C921 Crespo, Sarah Elizabeth Izzo.
Caracterização molecular do gene L1 de um provável novo tipo de Xipapillomavirus bovino, Brasil / Sarah Elizabeth Izzo Crespo. - Londrina, 2017.
63 f. : il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, , 2017.
Inclui bibliografia.

1. Bovino - Doenças - Tese. 2. Doenças do vírus do papiloma - Tese. 3. Virologia veterinária - Tese. I. Alfieri, Alice Fernandes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. . III. Título.

CDU 619

SARAH ELIZABETH IZZO CRESPO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE L1 DE UM PROVÁVEL
NOVO TIPO DE XIPAPILLOMAVIRUS BOVINO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Michele Lunardi
Universidade de Cuiabá – UNIC

Profa. Dra. Elis Lorenzetti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 13 de outubro de 2017.

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos queridos professores Amauri Alcindo Alfieri e Alice Fernandes Alfieri pela oportunidade que me foi dada e por todos os ensinamentos transmitidos desde a graduação.

Agradeço imensamente ao Dr. Rodrigo Alejandro Arellano Otonel pela ajuda, paciência e constante orientação. Sem ele, este trabalho não seria possível.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Michele Lunardi pela orientação e ajuda para a finalização deste trabalho.

Agradeço aos meus pais Estela Maria Salles Izzo Crespo e Jorge Danaga Crespo pela oportunidade e todos os sacrifícios que foram feitos para que eu pudesse estudar em Londrina e me tornar Médica Veterinária.

Agradeço aos amigos de laboratório pela ajuda, ensinamentos e correções, além de socorro quando necessário na análise das minhas amostras: Rodrigo P. Massi, Elis Lorenzetti-, Flávia Possatti, Fernanda Lavorente, Flávia Miyabe, Juliane Ribeiro, Edsel, Alaís Dall Agnol, Viviane Saporiti, Raquel Arruda, Nelson R. Santos, Vinícius Bon, Alisson, Juliana Fritzen, Marcos Vinícius e Renilda Calabrio.

Não posso deixar de agradecer a todos os amigos que me acolheram e confiaram em mim do Choque Canil do 5º BPM, Cabo Reginaldo Cruz, Juliana Assis, Ednea Olivera Longas, Idinei Machado, Denilson Dallaqua, Daniela Sanches Zonta, Domingues, Alexandre Mendes, Adriano Ávila e Eduardo Oliveira Xavier.

Aos meus amigos da Guarda Municipal de Londrina, Jesse Vander Bortoto, Jeferson Almeida, Rodrigo Menegaldo, Sérgio Akira, Ruan De Mari, Rodrigo Monti e Thiago Franco.

À todos, o meu muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal e no Laboratório Multiusuário em Saúde Animal (LAMSA), Unidade de Biologia Molecular, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Alice Fernandes Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**
- 4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

CRESPO, Sarah Elizabeth Izzo. Caracterização molecular do gene L1 de um provável novo tipo de Xipapillomavirus bovino, Brasil. 2017. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Papilomavírus (PV) são vírus oncogênicos que acometem diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem. São capazes de induzir tumores benignos (papilomas ou verrugas) e malignos (condilomas) em epitélio cutâneo e mucoso. O genoma viral é constituído por até 10 fases abertas de leitura (ORFs), sendo que a ORF L1, sequência de nucleotídeos mais conservada entre os PVs, é utilizada para a identificação de novos tipos virais. Este estudo teve como objetivo identificar os tipos de papilomavírus bovino (BPV) presentes em cinco amostras de papilomas provenientes de um rebanho bovino leiteiro da região do norte pioneiro do estado do Paraná e determinar a sua classificação taxonômica por meio de comparação dessas sequências com as sequências de nucleotídeos de outros PVs previamente identificados e depositados em base pública de dados (GenBank). O par de primers degenerados FAP54/59 foi utilizado em reação de PCR para a triagem das amostras de papilomas. Os fragmentos de 480 pb obtidos das cinco amostras analisadas, permitiram a identificação de cinco diferentes tipos de BPV no mesmo rebanho, sendo estes BPV10, BPV6 e dois subtipos mais similares a BPV11 e BPV3. A quinta amostra, denominada BPV/BRUEL8, foi identificada no terceiro animal analisado, a partir de uma amostra de papiloma cutâneo. A análise da sequência gerada com o emprego do primeiro par de primers indicou que a cepa BPV/BR-UEL8 apresentava apenas 77% de identidade com o isolado 7Z (KT315748). Adicionalmente, foram empregados primers específicos do gene L1 de BPV6 para a obtenção da sequência completa do gene L1 do provável novo tipo. O produto da PCR foi submetido à clonagem e sequenciamento. A análise filogenética envolvendo a sequência completa da ORF L1 com 1.521 pb possibilitou identificar que a cepa BPV/BR-UEL8 pertence ao gênero Xipapillomavirus com maior identidade (apenas 75,1% identidade de nt) com BPV15. Este resultado possibilitou caracterizar a cepa BPV/BR-UEL8 como um provável novo tipo viral. Nos últimos anos, estudos que avaliaram características moleculares de BPV revelaram grande diversidade de tipos virais envolvidos em infecções singulares e, principalmente, em infecções mistas. A identificação de novos tipos virais pode auxiliar na compreensão da patogenia da doença e na avaliação de novos tratamentos, assim como no desenvolvimento de vacinas eficazes contra a papilomatose bovina.

Palavras-chave: Bovinos. Papilomatose. Papilomas. BPV. Gene L1.

CRESPO, Sarah Elizabeth Izzo Crespo. Molecular characterization of the L1 gene of a putative new type of bovine Xipapillomavirus, Brazil. 2017. 63 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Papillomaviruses (PV) are oncogenic viruses that affect various mammalian species, including man. They can induce benign tumors (papillomas or warts) and malignant tumors (condylomas) in cutaneous and mucosal epithelium. The viral genome consists of up to 10 open reading frames (ORFs), and the L1 ORF, the most conserved nucleotide sequence among the PVs, is used to identify new viral types. The aim of this study was to identify the bovine papillomavirus (BPV) types present in five samples of papillomas from a dairy cattle herd at pioneer northern region of the state of Paraná and to determine their taxonomic classification by comparing these sequences with the sequences of nucleotides from other PVs previously identified and deposited in a public database (GenBank). The degenerate primer pair FAP54/59 was used in PCR reaction for the screening of papillomavirus samples. The 480 bp fragments obtained from the five analyzed samples allowed the identification of five different types of BPV in the same herd, being these BPV10, BPV6 and two subtypes more similar to BPV11 and BPV3. The fifth sample, named BPV/BR-UEL8, was identified in the third animal analyzed from a cutaneous papilloma sample. Analysis of the sequence generated using the first pair of primers indicated that the BPV/BR-UEL8 strain showed only 77% identity with the 7Z isolate (KT315748). In addition, specific primers of BPV6 L1 gene were used to obtain the complete L1 gene sequence of the putative new type. The PCR product was subjected to cloning and sequencing. The phylogenetic analysis involving the complete sequence of the L1 ORF with 1.521 bp allowed to identify that the BPV / BR-UEL8 strain belongs to the genus Xipapillomavirus with identity (only 75.1% identity of nt) with BPV15. This result made it possible to characterize the BPV/BR-UEL8 strain as a putative new viral type. In recent years, studies that have evaluated molecular characteristics of BPV revealed a wide variety of viral types involved in unique infections and, especially, mixed infections. The identification of new viral types can help to understand the pathogenesis of the disease and the evaluation of new treatments, as well as in the development of effective vaccines against bovine papillomatosis.

Keywords: Cattle. Papillomatosis. Papillomas. BPV. L1 gene.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

- Figura 1** – Organização genômica do papilomavírus bovino 1 (BPV1), genes E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1, L2 e a região longa de controle (LCR) entre a L1 e E6..... 15
- Figura 2** – Regiões genômicas do papilomavírus..... 15
- Figura 3** – Replicação de PVs no epitélio cutâneo..... 17

Artigo

- Figura 1** – Análise filogenética da cepa BPV/BR-UEL8 pelo método de Maximum-Likelihood baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene L1 de 15 tipos de BPVs, classificados no gênero Xipapillomavirus. BPV5 pertencente ao gênero Epsilonpapillomavirus, BPV1 gênero Deltapapillomavirus e BPV7 gênero Dioxypapillomavirus foram utilizados como outgroup 38
- Figura 2** – Análise filogenética utilizando o método de Maximum-Likelihood baseada nas sequências parciais de nucleotídeos de prováveis novos tipos de BPVs identificados, pertencentes ao gênero Xipapillomavirus e previamente depositados no GenBank, comparados a cepa BPV/BR-UEL8 (primers FAP 59/64) 39

LISTA DE QUADROS

Revisão de Literatura

- Quadro 1** – Classificação de PV de acordo com a identidade da sequências de nucleotídeos do gene L1 16
- Quadro 2** – Visão geral de papilomavírus bovinos caracterizados genomicamente..... 20

Artigo

- Quadro 1** – Identificação inicial das amostras de papilomas bovinos e sítio anatômico de colheita no animal..... 32
- Quadro 2** – Comparação das sequências parciais de nucleotídeos (480 pb) obtidas com o uso dos primers FAP 59/64 para cada amostra, com os tipos virais existentes e depositados no GenBank 37
- Quadro 3** – Comparação da sequência de nucleotídeos da amostra SC05 obtida com o uso dos primers específicos BPV6, com as sequências de nucleotídeos mais semelhantes de outros Xipapillomavírus depositadas no GenBank..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PV	<i>Papillomavirus</i> (Papilomavírus)
BPV	<i>Bovine papillomavirus</i> (Papilomavírus bovino)
Nt	<i>Nucleotide</i> (Nucleotídeos)
aa	<i>Amino acids</i> (Aminoácidos)
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Fase aberta de leitura)
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região longa de controle)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1	INTRODUÇÃO.....	14
1.2	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS PVs.....	14
1.3	PATOGENIA DA INFECÇÃO VIRAL.....	15
1.4	PAPILOMATOSE.....	18
1.5	PAPILOMATOSE BOVINA.....	19
1.6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
1.7	REFERÊNCIAS	23
2	OBJETIVOS	27
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3	ARTIGO – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GELE L1 DE UM PROVÁVEL NOVO TIPO DE <i>XIPAPILLOMAVIRUS</i> BOVINO, BRASIL	24
	RESUMO.....	28
	ABSTRACT.....	29
	INTRODUÇÃO.....	30
	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
	Coleta das amostras.....	32
	Exame histopatológico.....	32
	Preparação para a extração do ácido nucleico.....	32
	Extração do ácido nucleico.....	33
	Reação em cadeia da polimerase.....	33
	Sequenciamento e análise das sequências.....	34
	Clonagem e sequenciamento da amostra SC05.....	34
	Análise da sequência da amostra SC05.....	35
	RESULTADOS.....	37
	DISCUSSÃO.....	41
	REFERÊNCIAS.....	45

4	CONCLUSÕES	50
5	PERSPECTIVAS	51
	APÊNDICES	52
	APÊNDICE A - Lista de Reagentes	53
	APÊNDICE B - Soluções e Tampões.....	54
	APÊNDICE C -Protocolo e Técnicas	56
	APÊNDICE D - Matriz de identidade em nível de nt comparando a sequência L1 da cepa BPV/BR-UEL8 com as demais sequências L1 de BPVs já identificados e depositados no GenBank	61
	ANEXOS	62
	ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	63

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

Os papilomavírus (PVs), polyomavírus e o protótipo vírus símio (SV40) foram inicialmente classificados como subfamílias pertencentes a família *Papovaviridae*. Após análises moleculares, constatou-se que os genomas dos papilomavírus são de tamanhos e organização distintas das demais espécies virais dessa família e não compartilham grandes regiões de nucleotídeos (nt) ou aminoácidos (aa) semelhantes. A família *Papovaviridae* foi então dividida passando a constituir as famílias *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae* (COLE; CONZEN, 2001; DE VILLIERS et al., 2004).

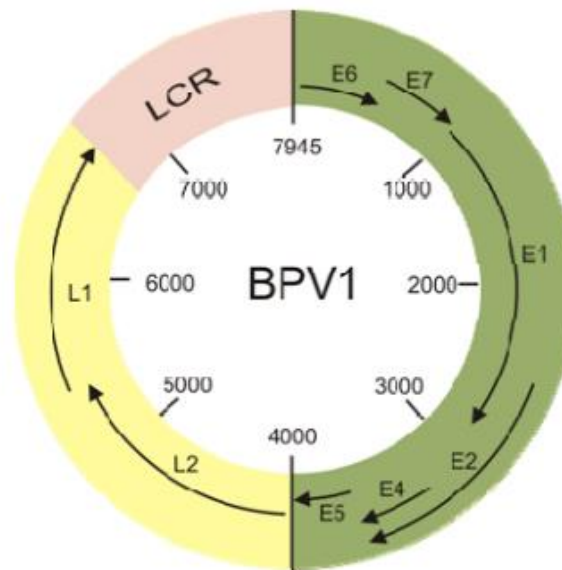
De acordo com o ICTV (*International Committee on the Taxonomy of Viruses* - 2016) a família *Papillomaviridae* é constituída por 49 gêneros que são classificados de acordo com a diversidade das sequências de nt da fase aberta de leitura (*Open Reading Frame* – ORF) do gene L1 e com suas características biológicas e patológicas (DE VILLIERS et al., 2004; BERNARD et al., 2010; ICTV, 2016).

1.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS PVS

Em todos os gêneros de PVs descritos, a organização do genoma é semelhante. Os vírions são constituídos por uma molécula de DNA fita dupla circular, com aproximadamente 8 mil pares de bases (pb), com 52 a 55 nm de diâmetro, e não possuem envelope (ZHENG; BAKER, 2006). Embora o genoma seja fita dupla, todas as ORFs estão contidas em apenas uma fita do DNA viral, demonstrando que somente essa fita desempenha a função de molde na transcrição (ZHU et al., 2012).

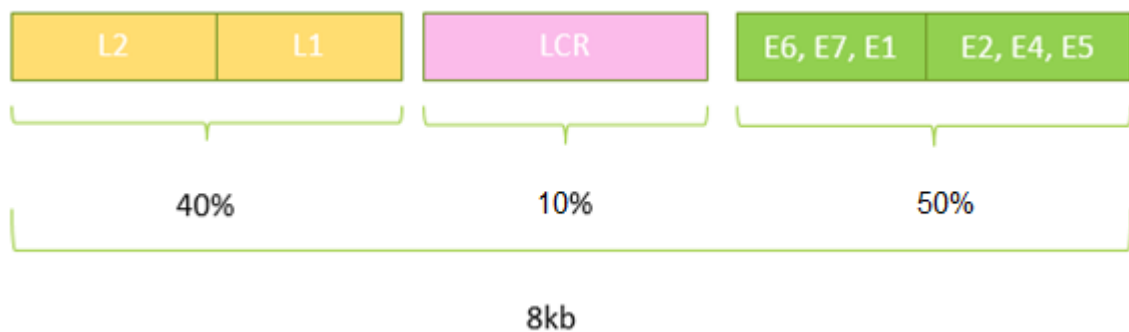
O genoma do PV pode ser dividido em três regiões: região tardia (*Late* - L), região inicial (*Early* - E) e região longa de controle (*Long Control Region* - LCR) (Figura 1). A região L ocupa 40% do genoma viral e possui duas ORFs (L1 e L2) que codificam as proteínas L1 (maior) e L2 (menor) do capsídeo viral (DE VILLIERS et al., 2004; ZHENG; BAKER, 2006) (Figura 2).

Figura 1. Organização genômica do papilomavírus bovino 1 (BPV1), genes E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1, L2 e a região longa de controle (LCR) entre a L1 e E6.



Fonte: ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017.

Figura 2. Regiões genômicas do papilomavírus.



Fonte: Adaptado: De VILLIERS et al., 2004.

A região E ocupa mais de 50% do genoma do vírus e codifica até oito proteínas necessárias para os processos iniciais da replicação viral e para a transformação da célula hospedeira. Das oito proteínas, três são reconhecidas como oncogênicas e modulam os processos de transformação celular (CAMPO, 1997; ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017) (ZHENG; BAKER, 2006).

A região LCR possui um segmento de aproximadamente 850 pb (10% do genoma do PV) que, apesar de não codificar proteínas, contém a origem da replicação, assim como os sítios de ligação de fatores de transcrição múltiplos que são importantes na regulação da transcrição do material genético (ZHENG; BAKER, 2006).

O gene L1 codifica a principal proteína do capsídeo e é o gene mais utilizado para a identificação de PVs. Um novo tipo de PV só é reconhecido quando o seu genoma completo for clonado e a sequência de nt da ORF L1 diferir em pelo menos 10% quando comparado aos demais PVs identificados. Com base neste critério, PVs que compartilham menos de 60% de identidade na sequência de nt do gene L1 são classificados em gêneros diferentes; PVs que compartilham entre 60 e 70% de identidade são classificados como diferentes espécies pertencentes ao mesmo gênero; os tipos de PVs dentro da mesma espécie compartilham de 71 a 89% de identidade da L1. Diferenças de 2 a 10% na sequência de nt definem subtipos e menos de 2% definem variantes virais (DE VILLIERS et al., 2004). A descrição de um novo isolado de PV, realizada por meio de análise da sequência parcial da ORF L1, define o vírus como um "provável novo tipo viral" (DE VILLIERS et al., 2004; OGAWA et al., 2004; BERNARD et al., 2010) (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação de PV de acordo com a identidade da sequência de nucleotídeos do gene L1.

Gene L1	Gênero	Espécie	Tipo	Subtipo	Variante
Identidade de nt	- de 60%	60-70%	71-89%	2-10 %	- de 2%

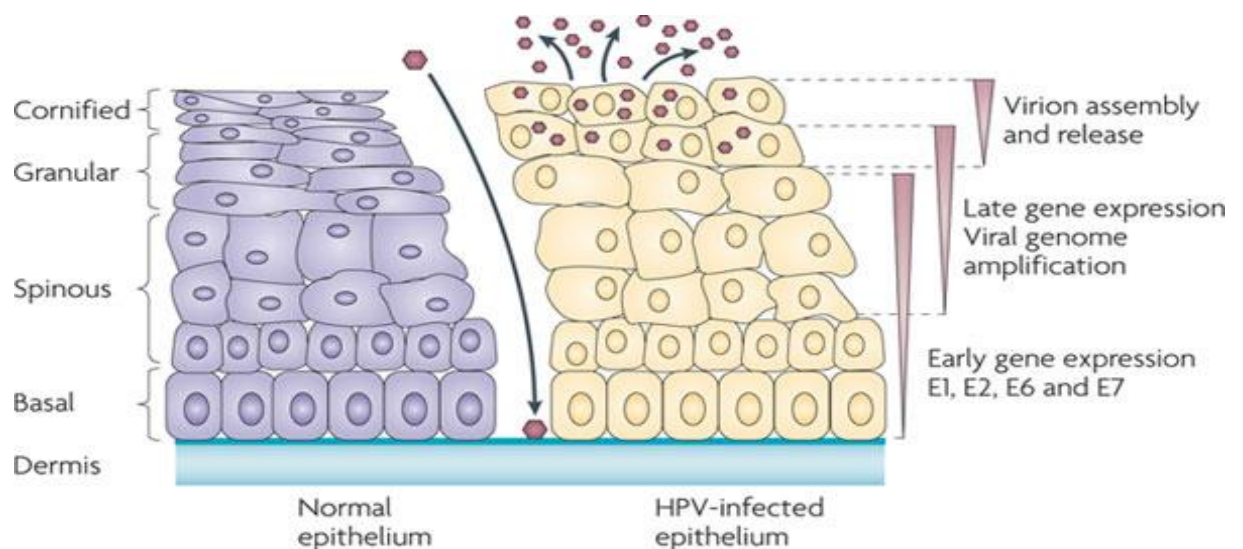
Fonte : Adaptado de: De VILLIERS, 2004.

1.3 PATOGENIA DA INFECÇÃO VIRAL

Os PVs são oncogênicos e a infecção viral ocorre nos queratinócitos onde o vírion expressa parte de seus genes nas camadas basal e suprabasal do epitélio escamoso estratificado. Após a ligação e a entrada dos vírus nas células, os vírions migram para o núcleo. O DNA viral se replica no núcleo das células hospedeiras de forma epissomal ou integrada (KLIMOV et al., 2002). Em papilomas em fase inicial e/ou benignos, o DNA viral está presente exclusivamente na forma epissomal e permanece circular no núcleo da célula hospedeira. Em lesões que sofrem transformação para malignidade, o DNA viral se integra ao genoma da célula hospedeira provocando a sua transformação (CULLEN et al., 1991). A integração do DNA do PV ao genoma da célula, que ocorre de forma aleatória, é um importante passo na progressão do tumor (WOSIACKI et al., 2002; ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017).

A amplificação do genoma viral ocorre de acordo com a fase de diferenciação celular. A progênie viral é montada em células altamente diferenciadas das camadas granulosa e córnea da pele e, em seguida, é liberada para o meio extracelular durante a descamação natural da epiderme (CAMPO, 1997; ZHENG; BAKER, 2006; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008; ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017). Os vírions podem reinfectar as células adjacentes durante a descamação da epiderme, razão pela qual os papilomas cutâneos são contagiosos e geralmente aparecem agrupados (ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017) (Figura 3).

Figura 3. Patogenia e replicação de PVs no epitélio cutâneo.



Nature Reviews | Cancer

Fonte: MOODY; LAIMINS, 2010.

As infecções podem ocorrer através de microlesões das células da camada basal em proliferação. O PV se espalha para as células vizinhas a partir de outras lesões papilomatosas, que frequentemente contém grande quantidade de partículas virais em sua camada superficial. A infecção pode causar lesões aparentes, como também pode permanecer latente. As infecções latentes podem provocar infecção clínica em condições de imunossupressão. O vírus pode ser encontrado em pele saudável de humanos e outros animais como um agente comensal (ANTONSSON; HANSSON, 2012).

O cultivo de PVs *in vitro* ainda não foi possível, uma vez que para a replicação viral é fundamental o aparato de diferenciação celular, inexistente em culturas de

monocamadas celulares (CAMPO, 2002). A dificuldade em encontrar sistemas de cultura de células apropriados para propagar estes vírus tem dificultado o progresso no estudo de funções virais e, em razão desse aspecto, técnicas moleculares são cada vez mais utilizadas para a caracterização de novos tipos de PVs (HOWLEY; LOWY, 2007).

As técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR) e de sequenciamento genético têm sido utilizadas para o diagnóstico, identificação e caracterização molecular de novos tipos de papilomavírus bovino (BPV) e contribuem para a elaboração de estratégias de controle da papilomatose bovina e tumores em humanos (CLAUS et al., 2007; SILVA et al., 2015).

Os primeiros PVs que tiveram o genoma completamente sequenciado foram: papilomavírus humano tipo 1 (*Human papillomavirus type 1*- HPV1) e BPV tipo 1 (*Bos taurus papillomavirus type 1* – BPV1) (CHEN et al., 1982; DANOS; KATINKA; YANIV, 1982), sendo que BPV1 é utilizado como protótipo para os estudos biológicos e moleculares dos PVs (ZHENG; BAKER, 2006).

1.4 PAPILOMATOSE

A papilomatose cutânea representa um problema sanitário para os rebanhos bovinos e, por isso, a realização de estudos visando à identificação dos tipos de BPVs envolvidos nas lesões cutâneas em bovinos no Brasil têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. A grande diversidade apresentada por esta família viral, tendo como modelo experimental os bovinos, pode ser de grande auxílio no estudo do câncer em humanos, na melhor compreensão da patogenia da doença e em estudos de evolução viral (SILVA et al., 2015)

A papilomatose é uma doença infectocontagiosa capaz de infectar mamíferos, aves e répteis (CAMPO, 1997; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008; BERNARD et al., 2010; ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017). As lesões induzidas pelo vírus, caracterizadas como proliferativas, são semelhantes entre as espécies e, em sua maioria, benignas tanto na pele (verrugas ou papilomas) quanto nas mucosas (condilomas) (HOWLEY; LOWY, 2001; ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017).

PVs foram identificados na maioria dos animais domésticos como cães (CPVs); caprinos (ChPV1); equinos (EcPVs); felinos domésticos (FdPVs); ovinos (OaPVs); bovinos (BPV), suínos (SsPV1) (VAN DYK et al., 2009; 2010; BERNARD et al., 2010;

ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017) e também em animais selvagens (ursos, alces, hienas) (STEVENS et al., 2013), mamíferos aquáticos (golfinhos, peixes-boi), psitacídeos e em seres humanos (ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017).

As infecções ocasionadas por PV geralmente são espécie-específicas, porém existem exceções. No sarcoide equino, BPVs 1, 2 (NASIR; CAMPO, 2008) e 13 são capazes de infectar equinos ocasionando tumores localmente invasivos (ALCÂNTARA et al., 2015). Além de equinos, a infecção heteróloga pelo BPV pode ocorrer em outros animais como búfalos (SILVESTRE et al., 2009; PANGTY et al., 2010), girafas (VAN DYK et al., 2011), antas (KIDNEY; BERROCAL, 2008) e zebras (VAN DYK et al., 2009). Recentemente, BPV14 foi identificado em lesões de sarcoide felino (ROPERTO et al., 2016). Devido aos poucos relatos de quebra da barreira interespecie, até o momento, não foi obtido um modelo animal suscetível à infecção pelo HPV. Com isso, alguns modelos experimentais de infecção pelo PV animal têm sido fundamentais na investigação da relação do vírus com o hospedeiro e em estudos que relacionam a associação da infecção viral com a presença de cofatores ambientais, a resposta imune contra o vírus e o desenvolvimento das primeiras vacinas (CAMPO, 2002).

1.5 PAPILOMATOSE BOVINA

Em bovinos foram descritos, até o momento, 15 tipos de BPV (Quadro 2). De acordo com a nova nomenclatura sugerida pelo ICTV (2016), BPVs estão agrupados nos gêneros *Xipapillomavirus* (BPV3, BPV4, BPV6, BPV9, BPV10, BPV11, BPV12 e BPV15), *Deltapapillomavirus* (BPV1, BPV2, BPV13 e BPV14), *Epsilonpapillomavirus* (BPV5 e BPV8) e *Dyoxipapillomavirus* (BPV7).

Quadro 2: Visão geral de papilomavírus bovinos caracterizados genomicamente.

Nomenclatura do PV	Abreviação	Gênero	Nº de depósito (GenBank)	Isolado de	Referência
<i>Bos taurus papillomavirus 1</i>	BPV1	Deltapapillomavirus	X02346	Fibroepiloma cutâneo	Chen et al. (1982)
<i>Bos taurus papillomavirus 2</i>	BPV2	Deltapapillomavirus	M20219	Fibroepiloma cutâneo	Groff e Lancaster (não publicado)
<i>Bos taurus papillomavirus 3</i>	BPV3	Xipapillomavirus	AF486184	Papiloma cutâneo	Terai et al. (2002)
<i>Bos taurus papillomavirus 4</i>	BPV4	Xipapillomavirus	X05817	Papiloma oral/esofágico	Patel et al. (1987)
<i>Bos taurus papillomavirus 5</i>	BPV5	Epsilonpapillomavirus	AF457465	Fibroepiloma em úbere	Terai et al. (2002)
<i>Bos taurus papillomavirus 6</i>	BPV6	Xipapillomavirus	AJ620208	Papiloma em úbere	Jarret et al. (1984)
<i>Bos taurus papillomavirus 7</i>	BPV7	Dyoxipapillomavirus	DQ217793	Papiloma em teto e pele saudável	Ogawa et al. (2007)
<i>Bos taurus papillomavirus 8</i>	BPV8	Epsilonpapillomavirus	DQ098913	Papiloma cutâneo	Tomita et al. (2007)
<i>Bos taurus papillomavirus 9</i>	BPV9	Xipapillomavirus	AB331650	Papiloma em teto	Hatama et al. (2008)
<i>Bos taurus papillomavirus 10</i>	BPV10	Xipapillomavirus	AB331651	Papiloma em teto	Hatama et al. (2008)
<i>Bos taurus papillomavirus 11</i>	BPV11	Xipapillomavirus	AB543507	Papiloma cutâneo	Hatama et al. (2011)
<i>Bos taurus papillomavirus 12</i>	BPV12	Xipapillomavirus	JF834523	Papiloma em língua	Zhu et al. (2012)
<i>Bos taurus papillomavirus 13</i>	BPV13	Deltapapillomavirus	JQ798171	Papiloma em orelha	Lunardi et al. (2013)
<i>Bos taurus papillomavirus 14</i>	BPV14	Deltapapillomavirus	KP276343	Papiloma cutâneo	Munday et al. (2015)
<i>Bos taurus papillomavirus 15</i>	BPV15	Xipapillomavirus	KX098515	Papiloma cutâneo	Silva et al. (2016)

Fonte: Adaptado de: RECTOR ; RANST, 2013.

A doença, apesar de ocorrer em qualquer fase da vida do animal, é observada com maior frequência em animais jovens, com menos de dois anos de idade, e em animais imunossuprimidos. A imunossupressão parece ser fundamental para o desenvolvimento de papilomatose disseminada e persistente (CAMPO, 2002).

As lesões ocasionadas pela infecção por PVs podem determinar prejuízos econômicos consideráveis a bovinocultura, tanto por perdas diretas acarretando a morte dos animais, quanto indiretas, representadas por redução na produtividade e no valor comercial dos animais e subprodutos como o couro (ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017). Em vacas leiteiras a ordenha pode tornar-se difícil devido à presença dos papilomas em tetos. Ulcerações e ruptura de lesões cutâneas podem predispor os animais à mastite e infecções secundárias (LUNARDI et al., 2016).

Estudos sugerem que certos tipos de BPV ocasionam lesões em apenas alguns tecidos específicos. Assim, inicialmente, BPV1 foi associado com papilomas em tetos e pênis (LAMBERT; BAKER; HOWLEY, 1988); BPV2 com papilomas cutâneos e papilomas alimentares (CAMPO et al., 1992); BPV3, BPV8, BPV11, BPV12 e BPV13 com papilomas cutâneos (CAMPO, 1997; TOMITA et al., 2007; HATAMA et al., 2011; ZHU et al., 2012; LUNARDI et al., 2013); BPV4 com papilomas do trato digestório superior (CAMPO et al., 1992) e BPV5, BPV6, BPV9 e BPV10 com papilomas em úbere e tetos (JARRETT et al., 1984; CAMPO, 1997; HATAMA; NOBUMOTO; KANNO, 2008). BPV14 e BPV15, recentemente descritos, foram associados a tumores em bexiga urinária e papilomas cutâneos, respectivamente (SILVA et al., 2016; ROPERTO et al., 2016).

Em muitos casos a manifestação clínica pode ser auto-limitante e branda. No entanto, algumas infecções com curso clínico prolongado e que determinam lesões extensas podem, ocasionalmente, progredir para câncer. A ingestão crônica da planta samambaia (*Pteridium aquilinum*) e a infecção com BPV2 têm sido implicadas na etiologia da hematúria enzoótica bovina (HEB) (CAMPO, 2002; WOSIACKI et al., 2002; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008; ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017). De maneira semelhante, a infecção por BPV4 e o consumo crônico de samambaia pode causar tumores no trato digestório superior (TDS) nessa espécie (WOSIACKI et al., 2002; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008; ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017). Casos muito semelhantes foram diagnosticados em humanos quando houve a ingestão do broto da planta samambaia associado a infecção por HPV (MARLIÉRE et al., 1998).

1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por tratar-se de uma doença infectocontagiosa, a manutenção de rebanhos com grande número de animais afetados pode resultar em menor lucro no produto final. Na dependência da taxa de ocorrência da eliminação de animais comprometidos clinicamente, a papilomatose pode interferir também no melhoramento genético dos rebanhos (CAMPO, 2002; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008).

Deve-se considerar que aspectos genéticos, nutricionais e imunológicos relacionados ao hospedeiro, cofatores ambientais e características biológicas de cada tipo viral podem influenciar na forma de manifestação clínica e na evolução da infecção por PV, bem como no processo de recuperação do animal acometido (ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017).

No 1º trimestre de 2017, foram abatidas 7,37 milhões de cabeças de bovinos no Brasil e mais de 5 bilhões de leite foram produzidos de acordo com o IBGE (2017) e apesar da papilomatose ser uma doença endêmica e disseminada, ainda não foram feitos estudos, de meu conhecimento, com relação às perdas econômicas que essa doença pode gerar seja pela morte de animais gravemente acometidos, diminuição da produção leiteira, dificuldade de ordenha, predisposição ou mesmo por doenças secundárias às lesões provocadas pelos papilomas.

Até o momento, ainda não foi desenvolvido um tratamento efetivo para a papilomatose. A identificação de novos tipos virais pode auxiliar na compreensão da patogenia da doença e na elaboração de novos tratamentos, assim como no desenvolvimento de medidas eficazes de imunoprofilaxia para a papilomatose bovina.

1.7 REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, B. K.; ALFIERI, A. A.; HEADLEY, S. A.; RODRIGUES, W. B.; OTONEL, R. A. A.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F. Molecular characterization of bovine Deltapapillomavirus (BPV1, 2, and 13) DNA in equine sarcoids. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 431–436, 2015.
- ALFIERI, A. A.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F. Papilomavírus. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 3. ed. Santa Maria/RS: UFSM, 2017. p. 475–493.
- BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K.; ZUR HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E. M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, 2010.
- BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research**, v. 39, n. 45, p. 1–19, 2008.
- CAMPO, M. S. Bovine papillomavirus and cancer. **The Veterinary Journal**, v. 154, n. 3, p. 175–188, 1997.
- CAMPO, M. S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p. 249–261, 2002.
- CAMPO, M. S.; JARRETT, W. F. H.; BARRON, R.; NEIL, B. W. O.; SMITH, K. T. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Research**, v. 52, p. 6898–6904, 1992.
- CHEN, E. Y.; HOWLEY, P. M.; LEVINSON, A. D.; SEEBURG, P. H. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. **Nature**, v. 299, n. 7, p. 529–534, 1982.
- CLAUS, M. P.; VIVIAN, D.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Análise filogenética de papilomavírus bovino associado com lesões cutâneas em rebanhos do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 314–318, 2007.
- COLE, C. N.; CONZEN, S. D. Polyomaviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (eds). *Fields virology*. 4.ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. Cap.63, p.2141-2174.
- CULLEN, A. P.; REID, R.; CAMPION, M.; LÖRINCZ, A. T. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. **Journal of Virology**, v. 65, n. 2, p. 606–612, 1991.
- DANOS, O.; KATINKA, M.; YANIV, M. Human papillomavirus 1 a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among Papovaviridae. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 324, p. 17–27, 1982.
- DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; ZUR HAUSEN,

H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

HATAMA, S.; ISHIHARA, R.; UEDA, Y.; KANNO, T.; UCHIDA, I. 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.

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.

HOWLEY, P. M.; LOWY, D. R. Papillomaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Field's Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. p. 2197–2229.

HOWLEY, P. M.; LOWY, D. R. Papillomaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Field's Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007. p. 2299–2354.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV. 9. ed. (2011). Papillomaviridae. Virus taxonomy - 2016 release. Disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/121/papillomaviridae. Acesso em: 01 de junho de 2017.

JARRETT, W. F. H.; CAMPO, M. S.; OWEIL, B. W.; LAIRD, H. M.; COGGINS, L. W. A novel bovine papillomavirus (BPV-6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: a member of a proposed new BPV subgroup. **Virology**, v. 136, n. 2, p. 255–264, 1984.

KIDNEY, B. A.; BERROCAL, A. Sarcoids in two captive tapirs (*Tapirus bairdii*): clinical, pathological and molecular study. **Veterinary Dermatology**, v. 19, p. 380–384, 2008.

KLIMOV, E.; VINOKOUROVA, S.; MOISJAK, E.; RAKHMANALIEV, E.; KOBSEVA, V.; LAIMINS, L.; KISSELJOV, F.; SULIMOVA, G. Human papilloma viruses and cervical tumours: mapping of integration sites and analysis of adjacent cellular sequences. **BMC Cancer**, v. 2, n. 24, p. 1–9, 2002.

LAMBERT, P. F.; BAKER, C. C.; HOWLEY, P. M. The genetics of bovine papillomavirus type 1. **Annual Reviews Genetic**, n. 22, p. 235–258, 1988.

LUNARDI, M.; ALFIERI, A. A.; OTONEL, R. A. A.; ALCÂNTARA, B. K.; RODRIGUES, W. B.; DE MIRANDA, A. B.; ALFIERI, A. F. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. **Veterinary Microbiology**, v. 162, p. 207–213, 2013.

LUNARDI, M.; TOZATO, C. C.; ALFIERI, A. F.; ALCÂNTARA, B. K.; VILAS-BOAS, L. A.; OTONEL, R. A. A.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A. Genetic diversity of bovine papillomavirus types, including two putative new types, in teat warts from dairy cattle herds. **Archives of Virology**, v. 161, n. 6, p. 1569–1577, 2016.

MARLIÈRE, C. A.; SANTOS, R. C.; GALVÃO, M. A. M.; SOARES, J. F.; EVANGELISTA, C. L. M.; GOMES, R. Q. F. Ingestão de broto de samambaia e risco de câncer de esôfago e estômago na região de Ouro Preto, MG. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 44, p. 225-229, 1998.

MOOD, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550-560, 2010.

MUNDAY, J. S.; THOMSON, N.; DUNOWSKA, M.; KNIGHT, C. G.; LAURIE, R. E.; HILLS, S. Genomic characterisation of the feline sarcoid-associated papillomavirus and proposed classification as *Bos taurus* papillomavirus type 14. **Veterinary Microbiology**, v. 177, p. 289-295, 2015.

NASIR, L.; CAMPO, M. S. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. **Veterinary Dermatology**, v. 19, p. 243-254, 2008.

OGAWA, T.; TOMITA, Y.; OKADA, M.; SHINOZAKI, K.; KUBONOYA, H.; KAIHO, I.; SHIRASAWA, H. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2191-2197, 2004.

OGAWA, T.; TOMITA, Y.; OKADA, M.; SHIRASAWA, H. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1934-1938, 2007.

PANGTY, K.; SINGH, S.; GOSWAMI, R.; SAIKUMAR, G.; SOMVANSI, R. Detection of BPV-1 and -2 and quantification of BPV-1 by real-time PCR in cutaneous warts in cattle and buffaloes. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 185-196, 2010.

PATEL, K. R.; SMITH, K. T.; CAMPO, M. S. The nucleotide sequence and genome organization of bovine papillomavirus type 4. **Journal of General Virology**, v. 68, p. 2117-2128, 1987.

RECTOR, A.; RANST, M. V. Animal papillomaviruses. **Virology**, v. 445, p. 213-223, 2013.

ROPERTO, S.; MUNDAY, J. S.; CORRADO, F.; GORIA, M.; ROPERTO, F. Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 190, p. 1-4, 2016.

SILVA, F. R. C.; CIBULSKI, S. P.; DAUDT, C.; WEBER, M. N.; GUIMARÃES, L. L. B.; STRECK, A. F.; MAYER, F. Q.; ROEHE, P. M.; CANAL, C. W. Novel bovine papillomavirus type discovered by rolling-circle amplification coupled with next-generation sequencing. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. 1-11, 2016.

SILVA, F. R. C.; DAUDT, C.; STRECK, A. F.; WEBER, M. N.; FILHO, R. V. L.; DRIEMEIER, D.; CANAL, C. W. Genetic characterization of Amazonian bovine papillomavirus reveals the existence of four new putative types. **Virus Genes**, v. 51, n. 1, p. 77-84, 2015.

SILVESTRE, O.; BORZACCHIELLO, G.; NAVA, D.; IOVANE, G.; RUSSO, V.; VECCHIO, D.; D'AUSILIO, F.; GAULT, E. A.; CAMPO, M. S.; PACIELLO, O. Bovine

Papillomavirus type 1 DNA and E5 oncoprotein expression in water buffalo fibropapillomas. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 636, 2009.

STEVENS, H.; HEYLEN, E.; KEYSER, K.; MAES, R.; KIUPEL, M.; WISE, A.; NELSON, K.; HOLEKAMP, K.; ENGH, A.; MCKNIGHT, C.; VAN RANST, M.; RECTOR, A. Complete genome sequence of the *Crocuta crocuta* papillomavirus type 1 (CcrPV1) from a spotted hyena, the first papillomavirus characterized in a member of the *Hyaenidae*. **Genome Announcements**, v. 1, n. 1, p. 2-12, 2013.

TERAI, M.; DE SALLE, R.; BURK, R. D. Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* papillomavirus. **Journal of Virology**, n. 76, p. 10020–10023, 2002.

TOMITA, Y.; LITERAK, I.; OGAWA, T.; JIN, Z.; SHIRASAWA, H. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. **Virus Genes**, v. 35, n. 2, p. 243–249, 2007.

VAN DYK, E.; OOSTHUIZEN, M. C.; BOSMAN, A. M.; NEL, P. J.; ZIMMERMANN D.; VENTER, E. H. Detection of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected and healthy free-roaming zebra (*Equus zebra*) populations in South Africa. **Journal of Virological Methods**, v. 158, n. 1-2, 141-151, 2009.

VAN DYK, E.; BOSMAN, A. M.; VANWILPE, E.; WILLIAMS, J. H.; BENGIS, R. G.; VANHEERDEN, J.; VENTER, E. H. 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, p. 80-85, 2011.

WOSIACKI, S. R.; DOS REIS, A. C. F.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Papilomavírus bovino tipo 2 na etiologia da hematuria enzoótica bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 121–130, 2002.

ZHENG, Z.-M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 2286–2302, 2006.

ZHU, W.; DONG, J.; SHIMIZU, E.; HATAMA, S.; KADOTA, K.; GOTO, Y.; HAGA, T. Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. **Archives of Virology**, v. 157, n. 1, p. 85–91, 2012.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar, por meio do uso de técnicas moleculares, o tipo de BPV presente em amostras de papilomas obtidas de vacas provenientes de um rebanho leiteiro do estado do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar os *primers* consensuais FAP59/64 para obter *amplicons* com 480 pb do gene L1 de BPV de amostras de lesões cutâneas (papilomas) e sequenciar os produtos amplificados na PCR para determinar o tipo de BPV presente nos papilomas avaliados;
- Nas amostras onde a análise da sequência parcial do gene L1 não determinar o tipo viral, utilizar *primers* específicos para BPV para amplificar a totalidade do gene L1;
- Clonar os *amplicons* obtidos na PCR específica e sequenciar os insertos dos clones gerados;
- Determinar a classificação taxonômica do tipo viral por meio de comparação da sequência do gene L1 com a de outros BPV disponíveis em bases públicas de dados (*GenBank*).

3 ARTIGO

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE L1 DE UM PROVÁVEL NOVO TIPO DE *XIPAPILLOMAVIRUS* BOVINO, BRASIL

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE L1 GENE OF A PUTATIVE NEW TYPE OF BOVINE *XIPAPILLOMAVIRUS*, BRAZIL

RESUMO

Papilomavírus (PV) são vírus oncogênicos que acometem diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem. São capazes de induzir tumores benignos (papilomas ou verrugas) e malignos (condilomas) em epitélio cutâneo e mucoso. O genoma viral é constituído por até 10 fases abertas de leitura (ORFs), sendo que a ORF L1, sequência de nucleotídeos mais conservada entre os PVs, é utilizada para a identificação de novos tipos virais. Este estudo teve como objetivo identificar os tipos de papilomavírus bovino (BPV) presentes em cinco amostras de papilomas provenientes de um rebanho bovino leiteiro da região do norte pioneiro do estado do Paraná e determinar a sua classificação taxonômica por meio de comparação dessas sequências com as sequências de nucleotídeos de outros PVs previamente identificados e depositados em base pública de dados (*GenBank*). O par de *primers* degenerados FAP54/59 foi utilizado em reação de PCR para a triagem das amostras de papilomas. Os fragmentos de 480 pb obtidos das cinco amostras analisadas, permitiram a identificação de cinco diferentes tipos de BPV no mesmo rebanho, sendo estes BPV10, BPV6 e dois subtipos mais similares a BPV11 e BPV3. A quinta amostra, denominada BPV/BR-UEL8, foi identificada no terceiro animal analisado, a partir de uma amostra de papiloma cutâneo. A análise da sequência gerada com o emprego do primeiro par de *primers* indicou que a cepa BPV/BR-UEL8 apresentava apenas 77% de identidade com o isolado 7Z (KT315748). Adicionalmente, foram empregados *primers* específicos do gene L1 de BPV6 para a obtenção da sequência completa do gene L1 do provável novo tipo. O produto da PCR foi submetido à clonagem e sequenciamento. A análise filogenética envolvendo a sequência completa da ORF L1 com 1.521 pb possibilitou identificar que a cepa BPV/BR-UEL8 pertence ao gênero *Xipapillomavirus* com maior identidade (apenas 75,1% identidade de nt) com BPV15. Este resultado possibilitou caracterizar a cepa BPV/BR-UEL8 como um provável novo tipo viral. Nos últimos anos, estudos que avaliaram características moleculares de BPV revelaram grande diversidade de tipos virais envolvidos em infecções singulares e, principalmente, em infecções mistas. A identificação de novos tipos virais pode auxiliar na compreensão da patogenia da doença e na avaliação de novos tratamentos, assim como no desenvolvimento de vacinas eficazes contra a papilomatose bovina.

Palavras-chave: Bovinos. Papilomatose. Verrugas. BPV. Gene L1.

ABSTRACT

Papillomaviruses (PV) are oncogenic viruses that affect various mammalian species, including man. They can induce benign tumors (papillomas or warts) and malignant tumors (condylomas) in cutaneous and mucosal epithelium. The viral genome consists of up to 10 open reading frames (ORFs), and the L1 ORF, the most conserved nucleotide sequence among the PVs, is used to identify new viral types. The aim of this study was to identify the bovine papillomavirus (BPV) types present in five samples of papillomas from a dairy cattle herd at pioneer northern region of the state of Paraná and to determine their taxonomic classification by comparing these sequences with the sequences of nucleotides from other PVs previously identified and deposited in a public database (GenBank). The degenerate primer pair FAP54/59 was used in PCR reaction for the screening of papillomavirus samples. The 480 bp fragments obtained from the five analyzed samples allowed the identification of five different types of BPV in the same herd, being these BPV10, BPV6 and two subtypes more similar to BPV11 and BPV3. The fifth sample, named BPV/BR-UEL8, was identified in the third animal analyzed from a cutaneous papilloma sample. Analysis of the sequence generated using the first pair of primers indicated that the BPV/BR-UEL8 strain showed only 77% identity with the 7Z isolate (KT315748). In addition, specific primers of BPV6 L1 gene were used to obtain the complete L1 gene sequence of the putative new type. The PCR product was subjected to cloning and sequencing. The phylogenetic analysis involving the complete sequence of the L1 ORF with 1.521 bp allowed to identify that the BPV / BR-UEL8 strain belongs to the genus Xipapillomavirus with identity (only 75.1% identity of nt) with BPV15. This result made it possible to characterize the BPV/BR-UEL8 strain as a putative new viral type. In recent years, studies that have evaluated molecular characteristics of BPV revealed a wide variety of viral types involved in unique infections and, especially, mixed infections. The identification of new viral types can help to understand the pathogenesis of the disease and the evaluation of new treatments, as well as in the development of effective vaccines against bovine papillomatosis.

Key words: Cattle. Papillomatosis. Warts. BPV. Gene L1.

INTRODUÇÃO

Algumas infecções ocorrem com relativa frequência no rebanho bovino brasileiro e por serem corriqueiras, suas consequências podem passar despercebidas tanto por produtores e médicos veterinários, quanto por órgãos oficiais de defesa sanitária animal. Dentre elas, destaca-se a papilomatose que é uma infecção viral que compromete animais de várias idades e categorias, em rebanhos de corte e leite. Na dependência da extensão das lesões cutâneas e mucosas ocasionadas pela infecção, a papilomatose pode ser responsável por prejuízos econômicos ocasionados por redução de produtividade, perda de peso, infecções secundárias intercorrentes, depreciação de subprodutos como o couro e, de forma direta, pela morte e/ou descarte precoce de animais gravemente acometidos, afetando o melhoramento genético do rebanho (ALFIERI; LUNARDI; ALFIERI, 2017), uma vez que a reposição de animais em um plantel representa parte importante dos custos de produção do sistema.

A papilomatose é causada pelo papilomavírus bovino (BPV), classificado na família *Papillomaviridae*. Trata-se de um vírus DNA fita dupla, não envelopado, que se propaga por meio de contato direto entre animais ou por fômites contaminados. BPV replica-se em células do epitélio cutâneo e mucoso ocasionando papilomas que podem, de forma aleatória, ou em associação a cofatores externos, progredir para tumores malignos, principalmente quando localizados no epitélio mucoso (CAMPO, 1997, 2002; HOWLEY; LOWY, 2001). Os casos mais comuns de tumores malignos em bovinos são representados pelo carcinoma do trato digestório superior e por tumores vesicais que ocasionam a forma clínica conhecida como hematúria enzoótica bovina (CAMPO, 2002; WOSIACKI et al., 2006).

Até o momento foram caracterizados 15 tipos de BPV (BPV1 a BPV15), que estão classificados em quatro diferentes gêneros de acordo com o ICTV (2016): *Deltapapillomavirus* (BPV1, BPV2, BPV13 e BPV14), *Xipapillomavirus* (BPV3, BPV4, BPV6, BPV9, BPV10, BPV11, BPV12 e BPV15), *Epsilonpapillomavirus* (BPV5 e BPV8) e *Dyoxipapillomavirus* (BPV7) (CHEN et al., 1982; JARRET et al., 1984; PATEL et al., 1987; TERAJ et al., 2002; OGAWA et al., 2007; HATAMA et al., 2008; 2011; ZHU et al., 2012; LUNARDI et al., 2013; MUNDAY et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Vários tipos virais podem acometer simultaneamente o mesmo animal e apesar de alguns BPVs predominarem em algumas regiões do corpo do animal, as lesões são

muito semelhantes independentemente do tipo viral envolvido na infecção (CAMPO, 2002; CLAUS et al., 2007; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008). Tais lesões podem ser únicas ou múltiplas e, em sua grande maioria, são benignas e apresentam regressão espontânea (CAMPO, 2002).

A fase aberta de leitura (ORF) L1 codifica a principal proteína do capsídeo, a proteína L1, a qual é bastante conservada e tem sido utilizada para a análise filogenética e identificação de prováveis novos tipos de papilomavírus (ZHU et al., 2012).

Nos últimos anos, com base na análise da sequência parcial de nucleotídeos (nt) da ORF L1, foram descritos diversos prováveis novos tipos de BPV (CLAUS et al., 2008, 2009; LUNARDI et al., 2013, 2016; SILVA et al., 2015; ROPERTO et al., 2016). A identificação de novos tipos virais pode contribuir com estudos sobre a patogenia da infecção e para a adoção de estratégias de controle e profilaxia mais específicas em rebanhos bovinos. Mais de 300 sequências de PV estão disponíveis no *GenBank*.

O objetivo deste estudo foi realizar a identificação e a caracterização molecular de cepas de BPV presentes em cinco amostras de papilomas cutâneos de vacas leiteiras, bem como, estabelecer as suas relações filogenéticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Cinco amostras de lesões cutâneas, com características semelhantes a papilomas, foram individualmente coletadas de diferentes sítios anatômicos de três vacas leiteiras, adultas, sem raça definida, no município de Siqueira Campos, Paraná. A propriedade onde foi realizada a coleta possui histórico de papilomatose e os animais encontravam-se medianamente acometidos. Os tecidos foram removidos cirurgicamente, individualmente e com uso de material descartável (Quadro 1). As amostras coletadas foram transportadas sob refrigeração e estocadas a -80°C . O procedimento de coleta de material biológico dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina, sob o número 5730.2016.83.

Quadro 1: Identificação das amostras de papilomas bovinos e sítio anatômico de coleta no animal.

Animal	Nº da amostra	Sítio anatômico	Idade do animal
01 - Amarela	SC01	Região lombo-sacra	5 anos
	SC02	Região escapular	
02 - Malhada	SC03	Rabo	6 anos
	SC04	Teto	
03 - Preta	SC05	Membro pélvico (bíceps femoral)	4 anos

Exame histopatológico

Os fragmentos de tecido fresco obtidos foram divididos em duas partes sendo que uma foi imediatamente fixada em formalina 10% (v/v) tamponada para a avaliação histopatológica por meio da técnica Hematoxilina e Eosina.

Preparação para a extração do ácido nucleico

Os demais fragmentos foram individualmente triturados em PBS pH 7,2, e as suspensões (10-20%, peso/volume) centrifugadas a 3000 x g por 5 min. Alíquotas de 250 µL dos sobrenadantes de cada amostra foram recolhidos e tratadas com SDS dodecil sulfato de sódio 1% e 0,2 mg/mL de proteinase K (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA). Após vigorosa homogeneização, as amostras foram incubadas a 56°C por 30 min.

Extração do ácido nucleico

Para a extração do ácido nucleico foram empregados os métodos de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e sílica/isoticianato de guanidina (BOOM et al., 1990), com modificações (ALFIERI et al., 2006). O DNA extraído foi eluído em 50 µL de água ultrapura tratada com DEPC (*diethyl pyrocarbonate UltraPure™ DEPC-treated Water*; *Invitrogen*, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e mantido a -20°C até o processamento. Uma alíquota de água ultrapura estéril foi utilizada como controle negativo durante o processo de extração do DNA. Não foi utilizado controle positivo durante o processamento das amostras.

Reação em cadeia da polimerase

Os *primers* genéricos FAP59 (5' - TAACWGTIGGICAYCCWTATT - 3') e FAP64 (5' - CCWATATCWVHCATITCICCATC - 3') que amplificam fragmentos com aproximadamente 480 pb do gene L1 foram utilizados para identificar os tipos de BPV presentes nas cinco amostras incluídas na análise (FORSLUND et al., 1999).

A reação de PCR foi realizada com 5 µL do DNA extraído e um *mix* para PCR constituído por 0,4 pmol/mL de cada *primer*; 200mM de dNTP (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA); 2,5 unidades de *Platinum Taq DNA polymerase* (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA); 5,0 µL de 10 x PCR *buffer* (20 mM Tris HCl, pH 8,4; 50 mM KCl); 1,5 mM de MgCl₂ e água ultrapura estéril para o volume final de 50 µL para cada amostra (CLAUS et al., 2007).

A amplificação do DNA viral foi realizada em termociclador com as seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa de 10 min a 94°C, seguida de 40

ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C e uma etapa final de 10 min a 72°C. Para a visualização do resultado, 5 µL dos produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL), em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM de EDTA), sob voltagem constante (90V) por aproximadamente 45 min. O gel foi visualizado e fotodocumentado sob luz ultravioleta (UV).

Sequenciamento e análise das sequências

Os *amplicons* obtidos foram excisados do gel, purificados utilizando o *Kit PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e quantificados por *Qubit™ Fluorometer* (Invitrogen Life Technologies®, Eugene, OR, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI3500 *Genetic Analyzer* utilizando o *Kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e os *primers sense* e *antisense* utilizados na PCR.

A qualidade das sequências foi analisada no *software Phred* e somente as sequências com qualidade de base igual ou superior a 20 foram aceitas. As sequências consensuais foram determinadas por meio do *software CAP3* (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e comparadas com sequências disponíveis depositadas no banco público de dados, *National Center for Biotechnology Information*, EUA *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>) por meio do *software BLASTn* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

O alinhamento e a identidade das sequências, em nível de nt, foi determinado utilizando-se o *software* MEGA versão 7.0.21 (KUMAR et al., 2016). A árvore filogenética e as análises foram baseadas no método *maximum-likelihood*, modelo *Kimura-2-parameter* (KIMURA, 1980). O intervalo de confiança *Bootstrapping* foi estatisticamente mantido em 1,000 cópias.

Clonagem e sequenciamento da amostra SC05

O produto da PCR com os *primers* FAP59/64, a partir da amostra de papiloma identificada como SC05, apresentou 77% de identidade em nível de nt com a amostra ainda não identificada 7Z (KT315748), pertencente ao gênero *Xipapillomavirus* e,

por isso, foi realizada uma segunda amplificação com *primers* BPV6-específicos disponíveis no laboratório, na tentativa de obter um *amplicon* de aproximadamente 1500 pb, uma vez que a amplificação com os *primers* BPV3 específicos não gerou sequências de qualidade satisfatória (5'- ATG TCA TAC TGG CTA CCA AGT TC - 3') e (5'- GGT GTG CAT TTT TCC GCC TAC - 3') (UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2014).

A reação de PCR foi realizada utilizando-se 5 µL do DNA extraído e um *mix* para PCR que consistiu de 0,4 pmol/mL de cada *primer*; 200mM de dNTP (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA); 2,5 unidades de *Platinum Taq DNA polymerase* (*Invitrogen Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA); 10 x PCR *buffer* (20 mM Tris HCl, pH 8,4; 50 mM KCl); 1,5 mM de MgCl₂ e água ultrapura estéril para o volume final de 50 µL.

A amplificação do DNA viral foi realizada em termociclador com as seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa de 10 min a 94°C, seguida de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56°C, 2 min a 72°C e uma etapa final de 7 min a 72°C.

A clonagem foi realizada utilizando o *Kit TOPO TA for sequencing* (*Invitrogen, Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para determinar a sequência completa do gene L1 do provável novo tipo de BPV, três clones da amostra foram selecionados e preparados para o sequenciamento com os *primers* específicos do plasmídeo T7 e T3, de acordo com as instruções do fabricante.

O plasmídeo contendo o inserto clonado foi recuperado utilizando o kit *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit* (*Invitrogen, Life Technologies*, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

O sequenciamento foi realizado como descrito anteriormente para as demais amostras.

Análise da sequência da amostra SC05

A qualidade da sequência de nt dos clones da amostra SC05 foi analisada como descrito anteriormente.

O alinhamento da sequência de nt e da sequência deduzida de aminoácidos (aa) foram realizados no *software* MEGA versão 7.0.21 (KUMAR et al., 2016). A árvore filogenética foi realizada no *software* MEGA versão 7.0.21 pelo método de *Maximum-Likelihood*, modelo *Kimura-2-parameter* (KIMURA, 1980) e o intervalo de confiança *Bootstrapping* foi estatisticamente mantido em 1,000 cópias.

A matriz de identidade de nt foi obtida por meio do *software* BioEdit versão 7.0.5 (*Ibis Therapeutics*, Carlsbad, CA, EUA) (HALL, 2011).

RESULTADOS

Com base nos achados histopatológicos, o diagnóstico de papilomatose cutânea foi confirmado para as cinco amostras analisadas. Os *primers* FAP59/64 amplificaram fragmentos do gene L1 com o tamanho esperado de aproximadamente 480 pb nas cinco lesões incluídas na amostragem.

As sequências de nt obtidas (480 pb), com o uso dos *primers* FAP59/64 dos papilomas SC01 e SC02 apresentaram 100% e 99% de identidade de nt com BPV10 (número de acesso no *GenBank*: HM245432) e com um novo provável subtipo BPV11 (número de acesso no *GenBank*: JQ897976), respectivamente. A amostra SC03 apresentou 98% de identidade com o provável subtipo BPV/CHI-SW2 (número de acesso no *GenBank*: KF751803), mais semelhante a BPV3 (número de acesso no *GenBank*: JQ897974), enquanto que a amostra SC04 apresentou 99% de identidade de nt com o BPV6 (número de acesso no *GenBank*: AJ620208) (Quadro 2).

Dois dos três animais analisados apresentaram infecção mista, ou seja, possuíam lesões provocadas por mais de um tipo viral de BPV, acometendo diferentes sítios anatômicos ao mesmo tempo (01-amarela e 02-malhada).

Quadro 2: Comparação das sequências parciais de nucleotídeos (480 pb) obtidas com o uso dos *primers* FAP59/64 para cada amostra, com os tipos virais existentes e depositados no *GenBank*.

Animal	Amostras (480 pb)	Tipo viral	Similaridade (nt) FAP 59/64	Amostra Padrão (GenBank)
Vaca 1 (amarela)	SC01	BPV10	100 %	HM245432
	SC02	BPV? (11)	99 %	JQ897976
Vaca 2 (malhada)	SC03	BPV? (3)	98 %	KF751803
	SC04	BPV6	99 %	AJ620208
Vaca 3 (preta)	SC05	BPV? (7Z)	77 %	KT315748

O produto amplificado com os *primers* FAP59/64 a partir da amostra de papiloma SC05, denominada cepa BPV/BR-UEL8, apresentou apenas 77% de similaridade na sequência de nt com um BPV não classificado até o presente momento, porém pertencente ao gênero *Xipapillomavirus* (número de acesso no *GenBank*: KT315748) (Quadro 2).

Os produtos dos *primers* específicos para BPV6 utilizados com o objetivo de obter a sequência completa do gene L1 foram clonados e a sobreposição das sequências possibilitou a determinação de uma sequência consensual com 1.521 pb. Na análise filogenética essa amostra demonstrou ser um provável novo tipo viral (Figuras 1 e 2).

Figura 1. Análise filogenética da cepa BPV/BR-UEL8 pelo método de *Maximum-Likelihood* baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene L1 (nt 1537 (225 - 1762)) de 15 tipos de BPVs, classificados no gênero *Xipapillomavirus*. BPV5 e BPV8 pertencentes ao gênero *Epsilonpapillomavirus*, BPV1, BPV2, BPV13 e BPV14 ao gênero *Deltapapillomavirus* e BPV7 ao gênero *Dioxypapillomavirus* foram utilizados como *outgroup*.

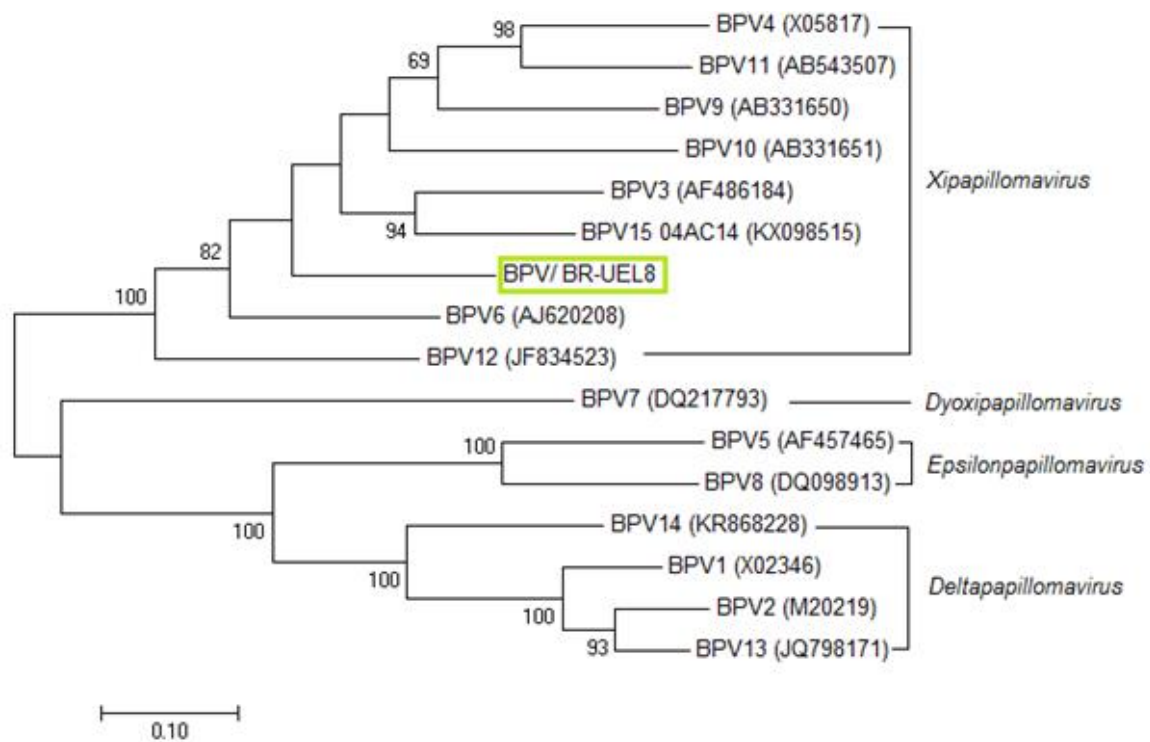
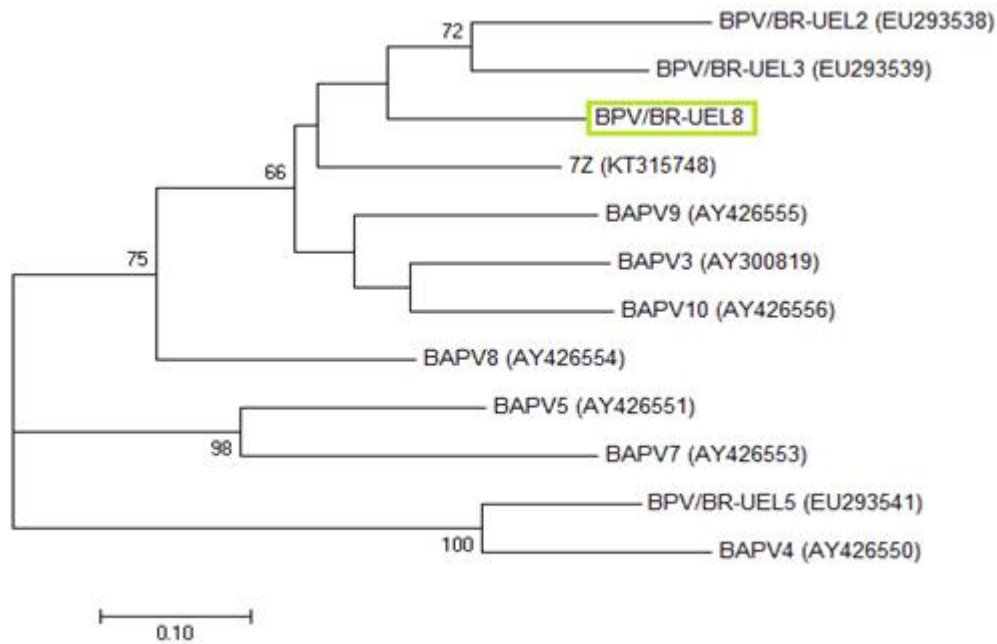


Figura 2. Análise filogenética utilizando o método de *Maximum-Likelihood* baseada nas sequências parciais de nucleotídeos do gene L1 (nt 319 (192 - 439)) de prováveis novos tipos de BPVs identificados, pertencentes ao gênero *Xipapillomavirus* e previamente depositados no *GenBank*, comparados com a cepa BPV/BR-UEL8 (FAP59/64).



Com a utilização dos *primers* específicos para BPV6, a matriz de identidade em nível de nt da cepa BPV/BR-UEL8 demonstrou apenas 69,3%, 70%, 70,7%, 72,3%, 72,5%, 73,8%, 74,2% e 75,1% de identidade de nt com BPV12, BPV10, BPV11, BPV9, BPV4, BPV3, BPV6 e BPV15, respectivamente, todos pertencentes ao gênero *Xipapillomavirus* (Quadro 3).

Quadro 3 - Comparação da sequência de nucleotídeos do gene L1 da amostra SC05 obtida com o uso dos *primers* específicos para BPV6, com as sequências de nucleotídeos do gene L1 completas dos outros *Xipapillomavírus* (BPV1-BPV15) depositadas no *GenBank*.

Animal	Amostra	Tipo Viral	Similaridade nt (<i>primers</i> BPV6)	Amostra Padrão (<i>GenBank</i>)
Vaca 3	SC 05	BPV3	73,8 %	AF486184
		BPV4	72,5%	X05817
		BPV6	74,2 %	AJ620208
		BPV9	72,3 %	AB331650
		BPV10	70,0 %	AB331651
		BPV11	70,7%	AB543507
		BPV12	69,3 %	JF834523
		BPV15	75,1%	KX098515

DISCUSSÃO

No presente estudo, cinco amostras de lesões cutâneas foram coletadas de três vacas de leite provenientes de uma propriedade com histórico de papilomatose e o exame histopatológico possibilitou classificar todas as lesões como papilomas cutâneos. A análise dos produtos de PCR do gene L1 possibilitou identificar cinco tipos virais diferentes acometendo simultaneamente o mesmo rebanho bovino leiteiro.

A análise dos fragmentos de tecido das amostras processadas constatou intensa proliferação do epitélio e células bem diferenciadas, com acantose típica. Este padrão também foi observado em outras lesões associadas a BPVs (ARALDI et al., 2007; CLAUS et al., 2009; MUNDAY, 2014).

De acordo com Campo (2002) e Borzacchiello e Roperto (2008), o padrão e localização da lesão ocasionada por BPV poderia ser associada ao tipo viral presente no papiloma. Porém, estudos afirmam que a relação entre os tipos de BPV e a morfologia da lesão ainda não foi bem compreendida (CLAUS et al., 2007; BATISTA et al., 2013).

A amostra SC04 que apresentou 99% de identidade de nt com BPV6, neste estudo, foi identificada em uma lesão papilomatosa no teto de uma vaca e, embora esse tipo viral seja encontrado mais frequentemente nessa região anatômica, diversos tipos virais também podem ser encontrados em úberes e tetos (JARRETT et al., 1984; OGAWA et al., 2004; CLAUS et al., 2007; CLAUS et al., 2008).

No presente estudo, BPV10 (SC01), comumente encontrado em úbere e tetos, foi identificado em uma amostra de papiloma cutâneo no dorso do animal, reforçando o resultado obtido por Batista e colaboradores (2013) que identificaram BPV10 em lesões epiteliais cutâneas. Silva e colaboradores (2012) já identificaram BPV10, também, na língua de uma vaca. Esses resultados sugerem que o padrão de localização da lesão, que em algumas situações já foi utilizado para definir o tipo de BPV, pode não ser conclusivo e deve ser interpretado com cautela.

O mesmo tipo viral de BPV pode determinar infecções múltiplas e coinfeções com localização e aspectos distintos (CLAUS et al., 2007; SILVA et al., 2012; LUNARDI et al., 2016) e mais de um tipo viral pode acometer o mesmo animal simultaneamente (CLAUS et al., 2007; SILVA et al., 2012). Neste estudo, dois animais apresentaram infecção mista por mais de um tipo de BPV e no mesmo rebanho foram identificados cinco tipos virais diferentes. Carvalho e colaboradores (2012) sugerem que

coinfecção por diferentes tipos virais pode ser devido a redução da resistência, como por exemplo, imunossupressão. No entanto, no presente estudo, esse aspecto não foi avaliado. Adicionalmente, os animais podem, por meio de contato direto animal-animal ou por fômites, contaminar uns aos outros com diferentes tipos de BPV, ocasionando a disseminação do vírus intrarebanho.

Todos os cinco papilomas analisados foram classificados como pertencentes ao gênero *Xipapillomavirus*, bastante prevalente e, frequentemente relatado em trabalhos recentes (HATAMA et al., 2008; HATAMA et al., 2011, LUNARDI et al., 2010, TOZATO et al., 2013; GRINDATTO et al., 2015; LUNARDI et al., 2016; SILVA et al., 2017). A alta incidência de papilomas pertencentes a esse gênero, nos rebanhos, ainda não possui explicações científicas até o momento.

A sequência de nt obtida com o uso dos *primers* FAP59/64 da amostra SC02, se mostrou mais semelhante ao BPV cutâneo isolado BPV/UFPE05BR (número de acesso no *GenBank*: JQ 897976), que apresenta 98% de identidade com BPV11 e foi classificado por Silva e colaboradores (2013) como um provável subtipo quando comparando a outros BPVs previamente depositados no *GenBank*. Já a sequência de nt obtida com o uso dos *primers* FAP59/64 da amostra SC03, se mostrou mais semelhante (98%) aos isolados BPV/CHI-SW2 (número de acesso no *GenBank*: KF751803) e BPV/CHI-SW1 (número de acesso no *GenBank*: KF751804), ambos isolados cutâneos prováveis subtipos de BPV3 de acordo com He et al. (2014). Ambas as amostras serão futuramente analisadas para a obtenção da sequência de nt do gene L1 de cada uma delas e para realizar adequada classificação. Até o presente momento, pode-se constatar apenas que ambas pertencem ao gênero *Xipapillomavirus*.

A sequência de nt da amostra SC05 com o uso dos *primers* FAP59/64 apresentou 77% de identidade de nt com o isolado 7Z (número de acesso no *GenBank*: KT315748), identificado como um provável novo tipo de BPV, pertencente ao gênero *Xipapillomavirus* que foi obtido a partir de pele saudável de um cervo vermelho nos alpes italianos. De acordo com Savini e colaboradores (2015), o isolado 7Z foi obtido de um cervo e resta determinar se os PVs podem ser transmitidos indiretamente pelos hospedeiros específicos ou não, uma vez que o contato entre ruminates selvagens e domésticos é incomum.

A papilomatose pode ser transmitida de forma direta (animal-animal) ou de forma indireta através do contato com superfícies contaminadas (CUBIE, 2013). Stocco dos

Santos e colaboradores (1998) demonstraram que sangue periférico de animais afetados pela papilomatose pode ser veículo carreador do vírus para bovinos saudáveis, e, mesmo moscas e carrapatos são potenciais transmissores de PVs (FINLAY et al., 2009). Até o momento, as informações sobre este sistema vírus-vetor-hospedeiro (bovino) são inexistentes; no entanto, não se pode excluir esta possibilidade.

A amostra SC05, papiloma cutâneo retirado do membro pélvico de uma das vacas, foi caracterizado como um provável novo tipo de BPV, denominado BPV/BR-UEL8. Por meio da determinação da sequência de nt do gene L1 a partir do uso de *primers* BPV6 específicos, foi possível estabelecer o posicionamento filogenético da cepa BPV/BR-UEL8 no gênero *Xipapillomavirus*, uma vez que a sequência completa do gene L1 apresentou apenas 75,1% de identidade de nt com BPV15. Nesse gênero estão também incluídos os BPVs 3, 4, 6, 9, 10, 11 e 12.

Quando comparado com outros gêneros de BPV, o gênero *Xipapillomavirus* demonstra grande diversidade de tipos virais. De acordo com Lunardi et al. (2016) diversos estudos relatam prováveis novos tipos de BPV incluídos em conjunto com representantes deste gênero, como por exemplo, BAPV3, BAPV8, BAPV9, BAPV10, BPV/BR-UEL2, BPV/BR-UEL3 e 7Z.

Mesmo com o crescente número de identificações de prováveis novos tipos, ainda não se pode afirmar se o vírus está mutando ou se a biodiversidade sempre esteve presente, porém não identificada. De acordo com Lunardi e colaboradores (2016), além dos BPVs já caracterizados, análises de fragmentos parciais do gene L1 têm permitido a descrição de prováveis novos tipos de BPVs, que aguardam a caracterização genômica completa para a definição taxonômica.

Carvalho e colaboradores (2012) detectaram 10 diferentes tipos de BPV juntamente com um provável novo subtipo de BPV11 na região Nordeste do Brasil. Tozato et al. (2013) relataram pela primeira vez a ocorrência de papilomatose envolvendo BPV7 e Lunardi e colaboradores (2013), identificaram BPV13, ambos estudos conduzidos no Paraná, região Sul do Brasil. Batista et al. (2013) identificaram 10 tipos distintos de BPV (BPV1-10) em um trabalho realizado na região Nordeste do Brasil. Silva et al. (2015) identificaram quatro prováveis novos tipos de BPV na região Amazônica, sendo dois deles pertencentes ao gênero *Xipapillomavirus* e, mais recentemente, Lunardi et al. (2016), também identificaram dois prováveis novos tipos, BPV/BR-UEL6 e BPV/BR-UEL7, a partir de papilomas coletados nos estados de Santa Catarina e Paraná, respectivamente.

Os *Xipapillomavirus* infectam apenas células epiteliais para induzir papilomas epiteliais verdadeiros (NASIR; CAMPO, 2008). A proliferação epitelial induzida por PVs, em sua maioria, regride espontaneamente, e o animal fica com cicatrizes nos locais das lesões de acordo com a extensão, número de papilomas e presença ou não de infecções secundárias. A depreciação do couro ocorre frequentemente, além de outras perdas como a diminuição da produção de leite e menor desempenho do rebanho.

A utilização de *primers* degenerados, seguido do sequenciamento e análise das sequências obtidas possibilitou a identificação de quatro tipos virais circulantes e a determinação e caracterização de um provável novo tipo em um rebanho leiteiro que, associado ao uso de *primers* específicos, têm se apresentado como a principal estratégia para identificação dos tipos de papilomavírus em lesões cutâneas (CLAUS et al., 2007; SILVA et al., 2015). Essas estratégias proporcionam ainda a identificação de prováveis novos tipos virais em diversas espécies, incluindo seres humanos (FORSLUND et al., 1999; ANTONSSON; HANSSON, 2002; OGAWA et al., 2004; ROPERTO et al., 2016).

Os papilomas, em sua maioria benignos, tendem a regredir espontaneamente de acordo com a resposta imune do animal. Entretanto, os vírus são capazes de permanecer latentes no epitélio saudável até que haja a queda dessa imunidade por fatores extrínsecos a papilomatose (CAMPO, 2002). A resposta imune contra o PV em bovinos costuma ser pequena e uma possível explicação para isso, deve-se ao fato de o vírus completar seu ciclo restrito ao epitélio e portanto não há estimulação significativa do sistema imune (CAMPO, 2006).

A identificação de novos tipos virais envolvidos na papilomatose bovina é de grande importância, uma vez que é necessário conhecer a epidemiologia molecular do BPV para a definição de medidas mais eficientes e vacinas para controle e profilaxia da infecção nos rebanhos bovinos de corte e leite no Brasil. Novas pesquisas devem ser realizadas para o estudo da patogenia do vírus no Brasil de forma que se possa melhorar a compreensão da biologia dos BPVs e permitir que sejam realizados progressos na terapia, diagnóstico e profilaxia de doenças relacionadas ao BPV.

REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A. A.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F. Papilomavírus. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. UFSM. 3. ed. Santa Maria RS: UFSM. 2017. p. 475–493.
- ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M. E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. Frequency of a group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, v. 38, p. 521–526, 2006.
- ANTONSSON, A.; HANSSON, B. G. 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.
- ARALDI, R.; ASSAF, S.; CARVALHO, R.; CARVALHO, M.; MAZZUCHELLI DE SOUZA, J.; MAGNELLI, R.; MÓDOLO, D.; ROPERTO, F.; STOCCO, R.; BEÇAK, W. Papillomaviruses : a systematic review. **Genetics and Molecular Biology**, n. 1, p. 1–21, 2017.
- BATISTA, M. V. A.; SILVA, M. A. R.; PONTES, N. E.; REIS, M. C.; CORTEGGIO, A.; CASTRO, R. S.; BORZACCHIELLO, G.; BALBINO, V. Q.; FREITAS, A. C. Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 368–373, 2013.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM VAN DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 495–503, 1990.
- BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research**, v. 39, n. 45, p. 1–19, 2008.
- CAMPO, M. S. Bovine papillomavirus and cancer. **Veterinary Journal**, v. 154, n. 3, p. 175–188, 1997.
- CAMPO, M. S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p. 249–261, 2002.
- CAMPO, M. S. Bovine papillomavirus: old system, new lessons? Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond. **Caister Academic Press**, Norfolk, 2006. p. 373–387.

CARVALHO, C. C. R.; BATISTA, M. V. A.; SILVA, M. A. R.; BALBINO, Q. V.; FREITAS, A. C. Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV 11 subtype in cattle. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 5, p. 441-447, 2012.

CHEN, E. Y.; HOWLEY, P. M.; LEVINSON, A. D.; SEEBURG, P. H. **The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. Nature**, v. 299, p. 529-534, 1982.

CLAUS, M. P.; VIVIAN, D.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Análise filogenética de papilomavírus bovino associado com lesões cutâneas em rebanhos do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 314-318, 2007.

CLAUS, M. P.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F.; FERRACIN, L. M.; FUNGARO, M. H. P.; ALFIERI, A. A. Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 3-4, p. 396-401, 2008.

CLAUS, M. P.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F.; SARTORI, D.; FUNGARO, M. H. P.; ALFIERI, A. A. Identification of the recently described new type of bovine papillomavirus (BPV-8) in a Brazilian beef cattle herd. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 25-28, 2009.

CUBIE, H. Diseases associated with human papillomavirus infection. **Virology**, v.445, p. 21-34, 2013.

FINLAY, M.; YUAN, Z.; BURDEN, F.; TRAWFORD, A.; MORGAN, I.; CAMPO, M.; NASIR, L. The detection of bovine papillomavirus type 1 DNA flies. **Virus Research**, n. 144, p. 315-317, 2009.

FORSLUND, O.; ANTONSSON, A.; NORDIN, P.; STENQUIST, B.; HANSSON, B. G. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 9, p. 2437-2443, 1999.

HALL, T. BioEdit: an important software for molecular biology. **GERF Bulletin of Biosciences**, v. 2, n. 1, p. 60-61, 2011.

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, p. 158-163, 2008.

HE, Z.; MENG, Q.; QIAO, J.; PENG, Y.; XIE, K.; LIU, Y.; CAI, X.; ZHANG, J.; CHEN, C. Mixed nipple infections caused by variant o BPV3 and putative new subtype of BPV in cattle. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 63, n. 1, p. 140-143, 2016.

HOWLEY, P. M.; LOWY, D. R. Papillomaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Field's Virology**, 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. p. 2197–2229.

JARRETT, W. F. H.; CAMPO, M. S.; OWEIL, B. W.; LAIRD, H. M.; COGGINS, L. W. A novel bovine papillomavirus (BPV-6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: a member of a proposed new BPV subgroup. **Virology**, v. 136, p. 255–264, 1984.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

LUNARDI, M.; ALFIERI, A. A.; OTONEL, R. A. A.; ALCÂNTARA, B. K.; RODRIGUES, W. B.; MIRANDA, A. B.; ALFIERI, A. F. Genetic Characterization of a novel bovine papillomavirus member of the *deltapapillomavirus* genus. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 207-213, 2013.

LUNARDI, M.; TOZATO, C. C.; ALFIERI, A. F.; ALCÂNTARA, B. K.; VILAS-BOAS, L. A.; OTONEL, R. A. A.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A. Genetic diversity of bovine papillomavirus types, including two putative new types, in teat warts from dairy cattle herds. **Archives of Virology**, v. 161, n. 6, p. 1569–1577, 2016.

MUNDAY, J. S. Bovine and Human Papillomaviruses: a comparative review. **Veterinary Pathology**, v. 51, p. 1063–1075, 2014.

MUNDAY, J. S.; THOMSON, N.; DUNOWSKA, M.; KNIGHT, C. G.; LAURIE, R. E.; HILLS, S. Genomic characterisation of the feline sarcoid-associated papillomavirus and proposed classification as *Bos taurus* papillomavirus type 14. **Veterinary Microbiology**, v. 177, n. 3–4, p. 289-295, 2015.

NASIR, L.; CAMPO, M. S. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovinds and equids. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 5, p. 243–254, 2008.

OGAWA, T.; TOMITA, Y.; OKADA, M.; SHINOZAKI, K.; KUBONOYA, H.; KAIHO, I.; SHIRASAWA, H. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas

and healthy teat skin. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2191–2197, 2004.

OGAWA, T.; TOMITA, Y.; OKADA, M.; SHIRASAWA, H. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1934-1938, 2007.

PATEL, K. R.; SMITH, K. T.; CAMPO, M. S. **The nucleotide sequence and genome organization of bovine papillomavirus type 4.** **Journal of General Virology**, v. 68, n. 8, p. 2117-2128, 1987.

ROPERTO, S.; MUNDAY, J. S.; CORRADO, F.; GORIA, M.; ROPERTO, F. Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 190, p. 1–4, 2016.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual.** 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SAVINI, F.; DAL MOLIN, E.; GALLINA, L.; CASÀ, G.; SCAGLIARINI, A. Papillomavirus in healthy skin and mucosa of Wild ruminants in the Italian Alps. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 52, v. 1, p. 82-87, 2015.

SILVA, F. R. C.; DAUDT, C.; STRECK, A. F.; WEBER, M. N.; FILHO, R. V. L.; DRIEMEIER, D.; CANAL, C. W. Genetic characterization of Amazonian bovine papillomavirus reveals the existence of four new putative types. **Virus Genes**, v. 51, n. 1, p. 77–84, 2015.

SILVA, F. R. C.; CIBULSKI, S. P.; DAUDT, C.; WEBER, M. N.; GUIMARÃES, L. L. B.; STRECK, A. F.; MAYER, F. Q.; ROEHE, P. M.; CANAL, C. W. Novel bovine papillomavirus type discovered by rolling-circle amplification coupled with next-generation sequencing. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. 1-11, 2016.

SILVA, M. A. R.; CARVALHO, C. C. R.; COUTINHO, L. C. A.; REIS, M. C.; DE ARAGÃO BATISTA, M. V.; CASTRO, R. S.; DOS ANJOS, F. B. R.; DE FREITAS, A. C. Co-infection of bovine papillomavirus and feline-associated papillomavirus in bovine cutaneous warts. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 6, p. 539–543, 2012.

SILVA, M. A. R.; BATISTA, M. V.; PONTES, N. E.; SANTOS, E. U.; COUTINHO L. C.; CASTRO, R. S.; BALBINO, V. Q.; FREITAS, A. C. Comparison of two PCR strategies for the detection of bovine papillomavirus. **Journal Virological Methods**, v. 192, n. 1/2, p. 55-58, 2013.

STOCCO DOS SANTOS, R. C.; LINDSEY, C. J.; FERRAZ, O. P.; PINTO, J. R.; MIRANDOLA, R. S.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; PEREIRA, C. A.; BEÇAK, W. Bovine

papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: An experimental model. **Journal of Generic Virology**, v. 79, p. 2127-2135, 1998.

TERAI, M.; DESALLE, R.; BURK, R. D. **Lack of canonical E6 and E7 open reading frames in bird papillomaviruses: *Fringilla coelebs* papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* papillomavirus.** **Journal of Virology**, v. 76, p. 10020-10023, 2002.

TOZATO, C. C.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F.; OTONEL, R. A. A.; DI SANTIS, G. W.; ALCÂNTARA, B. K.; HEADLEY, S. A.; ALFIERI, A. A. Teat papillomatosis associated with bovine papillomavirus types 6, 7, 9, and 10 in dairy cattle from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 905–909, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, F. G. FONSECA, A. F. ALFIERI, M. LUNARDI, R. A. A. OTONEL, A. A. ALFIERI. **Processo de Obtenção e recuperação de VLPS recombinantes obtidas do papilomavírus bovino tipo 2 expressas em células de mamíferos e o uso para composição vacinal.** Int. Cl.: A61K 39/12; C12N 15/11; C12N 15/37; C12N 15/10; G01N 33/569; [...]. 30 dez. 2013, 22 set. 2015. Revista da Propriedade Industrial, n. 2283 07, 2014.

WOSIACKI, S. R.; CLAUS, M. P.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Bovine papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 635–638, 2006.

ZHU, W.; DONG, J.; SHIMIZU, E.; HATAMA, S.; KADOTA, K.; GOTO, Y.; HAGA, T. Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. **Archives of Virology**, v. 157, n. 1, p. 85–91, 2012.

4 CONCLUSÕES

O uso dos *primers* FAP59/64 possibilitou a identificação de cinco tipos de BPV, incluindo BPV 10 (SC01), BPV6 (SC04), dois prováveis subtipos de BPV11 e BPV 3 (SC02 e SC03, respectivamente) e um provável novo tipo (SC-05 - BPV/BR-UEL8) a partir de cinco amostras de papilomas cutâneos obtidos de bovinos adultos da região norte do estado do Paraná;

O uso dos *primers* FAP59/64 associados aos *primers* específicos de BPV6 no sistema de PCR empregado neste estudo permitiu amplificar o gene que codifica a proteína estrutural L1 de um provável novo tipo de BPV que foi denominado BPV/BR-UEL8;

A sequência consensual da ORF L1 da cepa BPV/BR-UEL8, obtida a partir de clones e a sua comparação com sequências do mesmo gene de outros tipos de BPV descritos anteriormente, permitiu a classificação deste provável novo tipo de BPV no gênero *Xipapillomavirus*.

5 PERSPECTIVAS

Estudos adicionais estão sendo realizados com o objetivo de obter a sequência de nt do gene L1 das amostras SC02 e SC04 e a sequência genômica completa do provável novo tipo de BPV descrito na cepa brasileira identificada como BPV/BR-UEL8.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Lista de Reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 µL; 25 µmol *each* (100 mM dATP *Solution*, 100 mM dCTP *Solution*, 100 mM dGTP *Solution*, 100 mM dTTP *Solution*) (*Invitrogen Life Technologies*[®], Carlsbad, CA, EUA)
2. 10 x PCR-*Buffer* (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (*Invitrogen Life Technologies*[®], Carlsbad, CA, EUA)
3. *123 bp DNA Ladder* (*Invitrogen Life Technologies*[®], Carlsbad, CA, EUA)
4. 2-Mercapto-ethanol (C₂H₆O₅) P.M. 78,13 (Fluka[®], Hanover, NI, ALE)
5. Acetona, P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica[®], Diadema, SP, BR)
6. Ácido acético glacial, P.A. (CH₃COOH) P.M. 60,05 (Anidrol[®], Diadema, SP, BR)
7. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83 (Reagen[®], Colombo, PR, BR)
8. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®], Colombo, PR, BR)
9. Ácido etilenodiaminotetraácido sal disódico - EDTA, P.A. (C₁₀HMN₂O₈Na₂₂H₂O) P.M. 372,24 (Reagen[®], Colombo, PR, BR)
10. *UltraPure*[™] Agarose (*Invitrogen Life Technologies*[®], Carlsbad, CA, EUA)
12. Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) P.M. 46,07 (Synth[®], Diadema, SP, BR)
13. Álcool isoamílico ((CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth[®], Diadema, SP, BR)
14. Ampicilina trihidratada (USB[®], Cleveland, OH, EUA)
15. Azul de bromofenol (C₁₉H₁₀Br₄O₅S) (Anidrol[®], Diadema, SP, BR)
16. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®], Colombo, PR, BR)
17. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®], Colombo, PR, BR)
18. Clorofórmio, P.A. (CHCl₃) P.M. 119,38 (Dinâmica[®], Diadema, SP, BR)
19. Dodecil sulfato de sódio - Lauril sulfato de sódio - SDS (C₁₂NaO₄S) P.M. 288,38 (Synth[®], Diadema, SP, BR)
20. *Ethidium bromide* (C₂₁H₂₀N₃BO) P.M. 394,3 (Anidrol[®], Diadema, SP, BR)
21. Extrato de levedura (USB[®], Cleveland, OH, EUA)
22. Gibco BRL - *Concert*[™] *Rapid Plasmid Purification System* (*Invitrogen Life Technologies*[®], Carlsbad, CA, EUA)
23. Glicina, P.A (C₂H₅NO₂) (Anidrol[®], Diadema, SP, BR)
24. *Guanidine isothiocyanate* P.M. 118,16
25. Hidróxido de Sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®], Diadema, SP, BR)
26. Hidroximetil amino metano - TRIS 99% P.M. 121,14 (Anidrol[®], Diadema, SP, BR)
27. Lambda DNA - (*Invitrogen Life Technologies*[®], Carlsbad, CA, EUA)
28. Metanol, P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Anidrol[®], Diadema, SP, BR)
29. *Platinum Taq DNA Polymerase 500 units* (*Invitrogen Life Technologies*[®], Carlsbad, CA, EUA)
30. *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (*Invitrogen Life Technologies*[®], Carlsbad, CA, EUA)
31. Sacarose, P.A. - sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (Reagen[®], Colombo, PR, BR)
32. *Silicon dioxide* (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma[®], Saint Louis, MO, EUA)
33. *TOPO TA Cloning kit for Sequencing* (*Invitrogen Life Technologies*[®], Carlsbad, CA, EUA)
34. Triton X-100 (*Invitrogen Life Technologies*[®], Saint Louis, MO, EUA)
35. Triptona (*Acumedia Manufacturers*[®], Lansing, MI, EUA)
36. Água ultrapura tratada com DEPC (*diethyl pyrocarbonate*) (*Invitrogen, Life Technologies*[®], Carlsbad, CA, EUA)

APÊNDICE B

Soluções e Tampões

Hidratação da sílica

- 6 g de sílica (Sigma[®], Saint Louis, MO, EUA)
- Adicionar 50 mL de água bidestilada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
- Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Adicionar 600 µL de HCl para ajustar o pH (pH 2,0)
- Aliquotar

Solução L6

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN) (Sigma[®], Saint Louis, MO, EUA)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 mL de Triton X-100

Solução L2

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN) (Sigma[®], Saint Louis, MO, EUA)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

Tampão de amostra

- Azul de bromofenol 0,25%
- Sacarose (sucrose) (C₁₂H₂₂O₁₁) 45%

Tampão de corrida: TBE (TRIS - Ácido bórico - EDTA) 10 x [] pH 8,4

- 0,89 M TRIS
- 0,89 M ácido bórico
- 0,02 M EDTA dissódio
- Água bidestilada q.s.p. 1 L

Tampão fosfato salina (PBS) pH 7,2

- 137 mM cloreto de sódio (NaCl)
- 3 mM cloreto de potássio (KCl)
- 8 mM sódio fosfato dibásico anidro (Na₂HPO₄)
- 15 mM potássio fosfato monobásico (KH₂PO₄)
- Água bidestilada autoclavada q.s.p. 1 L

Fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (24:25:1)

- 24 mL de fenol saturado
- 25 mL de clorofórmio
- 1 mL de álcool isoamílico

Meio Luria Bertani (LB) sólido para 500 mL

- 5 g de triptona
- 2,5 g de extrato de levedura
- 2,5 g de NaCl
- Dissolver em 400 mL de água destilada
- Completar para 500 mL (becker).
- 3,25 g de ágar em cada *Erlenmeyer*.
- Adicionar 250 mL da solução a 3,25g de ágar em cada *Erlenmeyer* que será autoclavado.

Meio LB líquido

- 5 g de triptona
- 2,5 g de extrato de levedura
- 2,5 g de NaCl
- Dissolver em 400 mL de água bidestilada e completar para 500 mL
- Aliquotar a solução em tubos de 3 mL e 5 mL e autoclavar

Primers

- FAP59: 5' - TAACWGTIGGICAYCCWTATT - 3'
- FAP64: 5' - CCWATATCWVHCATITCICCATC - 3'
- BPV 6 Fwd: 5' - GGCCATGGATGTCATACTGGCTACCAAGTTC - 3'
- BPV 6 Rv: 5' - GGGGGTCTGACTTATGCATTTTCCGCCTAC - 3'

APÊNDICE C

Protocolo e Técnicas

Suspensão de fragmentos de tecidos

- Triturar 1 g do fragmento do tecido (papiloma) com pistilo em gral de porcelana estéril
- Adicionar 9 mL de PBS 1x.
- Homogeneizar em vórtex, congelar, descongelar rapidamente por 3 vezes.
- Centrifugar a 4.000 x g /15 min.
- Recolher 500 µL do sobrenadante em microtubos tipo *ependorf* para extração do DNA.

Lise celular

- 250 µL do sobrenadante do macerado
- Diluir em 250 µL de PBS 1x
- 50 µL de SDS 10 %
- 10 µL de proteinase K (0,2 mg/mL)
- Homogeneizar em vórtex por 10 s
- Incubar em banho-maria à 56°C / 30 min

Extração do DNA pela técnica fenol / clorofórmio / álcool isoamílico - sílica / isotiocianato de guanidina

- Adicionar 500 µL de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico, após a lise celular
- Homogeneizar em vórtex
- Incubar em banho-maria à 56°C / 15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g /12 min
- Recolher a fase aquosa em outro microtubo tipo *ependorf* de 1.500 µL
- Adicionar 25 µL de sílica hidratada
- Adicionar 1.000 µL de solução L6
- Homogeneizar em vórtex
- Agitar durante 30 min em temperatura ambiente
- Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 1.000 µL de etanol 70% a -20°C
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante
- Adicionar 1.000 µL de etanol 70% a -20°C
- Homogeneizar em vórtex

- Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante
- Adicionar 1.000 µL de acetona PA a -20°C
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g / 2 min
- Desprezar o sobrenadante
- Secar o *pellet* em banho-maria a 56°C / 15 min
- Adicionar 50 µL de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Incubar em banho-maria à 56°C / 15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g / 4 min
- Recolher o sobrenadante
- Estocar a -20°C

Gel de agarose a 2%

- 1 g de agarose
- 50 mL TEB 1 x
- 30 µL de brometo de etídeo

Purificação de produto de PCR excisado do gel

1. Pesar o fragmento excisado do gel (até 400 mg) em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL).
2. Adicionar 30 µL do tampão L3 para cada 10 mg de gel.
3. Incubar o tubo à 50°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min.
4. Após dissolver, incube por mais 5 min.
5. Colocar a coluna em um novo tubo e pipetar a solução anterior na coluna.
6. Centrifugar por 12.000 x g / 1 min.
7. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
8. Adicionar 700 µL de tampão de lavagem W9 e incubar a temperatura ambiente / 5 min.
9. Centrifugar a 12.000 x g / 1 min.
10. Descartar o filtrado e recolocar a coluna.
11. Centrifugue a coluna a 12.000 x g / 1 min para remover o tampão residual.
12. Colocar a coluna em um novo tubo (1,5 mL).
13. Adicionar 20 µL de solução de eluição E2 no centro da coluna.
14. Incubar a temperatura ambiente por 2 min.
15. Centrifugar a 12.000 x g / 2 min.
16. Estocar a -20°C.

Ligação do produto da PCR ao vetor

1. Em um tubo de microcentrífuga (0,6 mL) adicionar:

Solução do DNA a ser clonado: 0,5 a 4 µL
 1,0 µL da solução de 1.2 M NaCl e 0,06 M MgCl₂
 H₂O autoclavada 6 µL q.s.p

Vetor TOPO: 1,0 μ L

Homogeneizar a reação delicadamente e incubar por 1h

Manter a reação em gelo até proceder a transformação

Pré-inoculação de *E.coli* One Shot[®] (Invitrogen Life Technologies[®], Carlsbad, CA, EUA)

1. 3 mL de meio LB líquido autoclavado.
2. Acrescentar 15 μ L de células para cada 3 mL de LB.
3. Homogeneizar lentamente o tubo com LB.
4. Incubar em *Shaker* à 37°C e 180 rpm, *overnight*.

Preparação de células competentes

1. Diluir a pré-cultura (150 μ L em 5 mL de meio LB líquido) e incubar à 37°C, 180 rpm, até DO 600 nm=0,4-0,6 (aproximadamente 1 h).
2. Logo após, deixar o tubo em banho de gelo por 5 min.
3. Centrifugar 3 mL da cultura em dois tubos de microcentrífuga (1,5 mL em cada tubo), a 5000 rpm / 5 min.
OBS: Manter as células e soluções em banho de gelo.
4. Eliminar o sobrenadante por inversão do tubo e adicionar ao precipitado 500 μ L de 50mM CaCl₂.
5. Homogeneizar.
6. Transferir o conteúdo dos dois tubos para outro tubo.
7. Manter em banho de gelo por 10 min.
8. Centrifugar a 5000 rpm / 5 min e eliminar o sobrenadante posteriormente.
9. Ressuspender as células em 300 μ L de 50 mM CaCl₂.
10. Manter em banho de gelo por 20 min.
11. Aliquotar 50 μ L de células competentes em tubos de microcentrífuga e estocar a -20°C.

Transformação

1. Adicionar 3 μ L do produto da ligação a 50 μ L de células competentes e colocar em banho de gelo por 20 min.
2. Incubar a mistura por 2 min a 42°C em banho-maria.
3. Transferir imediatamente para banho de gelo.
4. Adicionar 1 mL de LB líquido e incubar por 1 h a 37°C sob agitação (180 rpm).
5. Centrifugar a 5.000 rpm / 10 min.
6. Descartar o sobrenadante.
7. Ressuspender o sedimento em 100 μ L de LB líquido.
8. Semear em duas placas com LB sólido, contendo 75 ug / mL de ampicilina, com o auxílio da alça de *Drigalsk*.
9. Incubar em estufa a 37°C por 24 h.

Extração do plasmídeo

1. Aliquotar 5 μ L de meio LB líquido em um tubo de ensaio.

2. Adicionar ampicilina (100 µg /mL).
3. Com o auxílio de um palito, realizar a semeadura de uma colônia de bactérias no tubo.
4. Incubar sob agitação (180 rpm) a 37°C / 12 h.
5. Transferir 1,5 mL da cultura em um tubo de microcentrífuga e centrifugar a 5.000 rpm/ 12 min. Descartar o sobrenadante. Repetir o procedimento.
6. Adicionar 210 µL de G1 para ressuspender as células.
7. Adicionar 210 µL de G2 para lisar as células e inverter gentilmente cinco vezes. Manter à temperatura ambiente por 5 min.
8. Adicionar 280 µL de G3 para neutralizar e inverter gentilmente cinco vezes. Centrifugar a 12.000 rpm / 10 min.
9. Transferir o sobrenadante para a coluna.
10. Adicionar 700 µL de G4 (tampão de lavagem com etanol) no centro da coluna.
11. Centrifugar a 12.000 rpm / 1 min (duas vezes).
12. Adicionar 75 µL de água no centro da coluna. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
13. Centrifugar a 12.000 rpm / 2 min.

PCR utilizando FAP59/64

- 2,5 µL de 10x PCR *Buffer* (50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl [pH 8,3])
 - 0,75 µL de MgCl₂
 - 2 µL de dNTP
 - 0,5 µL de cada *primer* a 5 pmol/mL
 - 0,25 unidades de *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA)
 - 2,5 µL de DNA
 - H₂O q.s.p volume final de 25 µL
- Etapas para amplificação:**
- Desnaturação inicial (10 min a 94°C)
 - Seguida de 40 ciclos de: i) desnaturação por 1 min a 94°C; ii) anelamento por 1 min a 50°C; iii) extensão por 1 min a 72°C; iv) extensão final por 10 min a 72°C

PCR utilizando BPV6Fw/BPV6Rv

- 5 µL de 10x PCR *buffer* (50 mM KCl; 20 mM Tris-HCl [pH 8,3])
 - 1,5 µL de MgCl₂
 - 2 µL de dNTP
 - 2,5 µL de cada *primer* a 5 pmol/mL
 - 1,0 unidade de *Platinum Taq DNA polymerase* (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA)
 - 5 µL de DNA
 - H₂O q.s.p volume final de 50 µL
- Etapas para amplificação:**
- Desnaturação inicial (10 min a 94°C)
 - Seguida de 40 ciclos de: i) desnaturação por 1 min a 94°C; ii) anelamento por 1 min a 56°C; (iii) extensão por 2 min a 72°C; iv) extensão final por 7 min a 72°C

Quantificação de produto de PCR

- Preparar a solução *Quant-iT™ Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iT™* no *Quant-iT™ Buffer*, 1:200. São necessários 200 µL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.
- Homogeneizar em vórtex
- No microtubo das amostras adicionar 198 µL da solução *Quant-iT™ Working Solution* a 2 µL do DNA purificado.
- No microtubo do padrão 0 adicionar 190 µL da solução *Quant-iT™ Working Solution* a 10 µL do padrão 0
- No microtubo do padrão 100 adicionar 190 µL da solução *Quant-iT™ Working Solution* a 10 µL do padrão 100
- Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2 – 3 s
- Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
- Realizar a leitura utilizando *Qubit™ fluorometer* (Invitrogen Life Technologies®, Eugene, OR, EUA)
- Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra

APÊNDICE D

Matriz de identidade em nível de nt comparando a sequência L1 da cepa BPV/BR-UEL8 com as demais sequências L1 de BPVs já identificadas e depositados no *GenBank*.

Seq->	BPV1	BPV2	BPV3	BPV4	BPV5	BPV6	BPV7	BPV8	BPV9	BPV10	BPV11	BPV12	BPV13	BPV14	BPV15	BPV/BR-UEL8
BPV1 (X02346)	ID	0,848	0,552	0,541	0,618	0,552	0,522	0,622	0,541	0,539	0,558	0,537	0,858	0,739	0,540	
BPV2 (M20219)	0,848	ID	0,560	0,552	0,624	0,574	0,522	0,621	0,554	0,557	0,550	0,555	0,883	0,734	0,546	0,561
BPV3 (AF486184)	0,552	0,560	ID	0,722	0,530	0,719	0,549	0,534	0,719	0,701	0,719	0,687	0,550	0,567	0,780	0,738
BPV4 (X05817)	0,541	0,552	0,722	ID	0,529	0,712	0,532	0,544	0,726	0,693	0,774	0,673	0,554	0,559	0,721	0,725
BPV5 (AF457465)	0,618	0,624	0,530	0,529	ID	0,537	0,505	0,758	0,543	0,524	0,528	0,541	0,612	0,630	0,517	0,530
BPV6 (AF620208)	0,552	0,574	0,719	0,712	0,537	ID	0,547	0,546	0,702	0,689	0,707	0,679	0,564	0,557	0,740	0,742
BPV7 (DQ217793)	0,522	0,522	0,549	0,532	0,505	0,547	ID	0,510	0,552	0,537	0,549	0,535	0,530	0,524	0,543	0,553
BPV8 (DQ098913)	0,622	0,621	0,534	0,544	0,758	0,546	0,510	ID	0,524	0,520	0,537	0,541	0,628	0,629	0,522	0,530
BPV9 (AB331650)	0,541	0,554	0,719	0,726	0,543	0,702	0,552	0,524	ID	0,697	0,743	0,663	0,547	0,551	0,722	0,723
BPV10 (AB331651)	0,539	0,557	0,701	0,693	0,524	0,689	0,537	0,520	0,697	ID	0,700	0,669	0,551	0,549	0,721	0,700
BPV11 (AB543507)	0,558	0,550	0,719	0,774	0,528	0,707	0,549	0,537	0,743	0,700	ID	0,667	0,555	0,545	0,730	0,707
BPV12 (JF834523)	0,537	0,555	0,687	0,673	0,541	0,679	0,535	0,541	0,663	0,669	0,667	ID	0,554	0,564	0,687	0,693
BPV13 (UQ798171)	0,888	0,883	0,550	0,554	0,612	0,564	0,530	0,628	0,547	0,551	0,555	0,554	ID	0,732	0,546	0,555
BPV14 (KR868228)	0,739	0,734	0,567	0,559	0,630	0,557	0,524	0,629	0,551	0,549	0,545	0,564	0,732	ID	0,556	0,581
BPV15 04AC14 (KX098515)	0,540	0,546	0,780	0,721	0,517	0,740	0,543	0,522	0,722	0,721	0,730	0,687	0,546	0,556	ID	0,751
BPV/BR-UEL8	0,544	0,561	0,738	0,725	0,530	0,742	0,553	0,530	0,723	0,700	0,707	0,693	0,555	0,581	0,751	ID

ANEXO

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 104/2016

Londrina, 01 de Junho de 2016.

Prezada Pesquisadora,


Certificamos que o projeto intitulado "**Caracterização molecular do gene L1 de um provável novo tipo de Papilomavírus Bovino identificado no Paraná**", protocolo CEUA nº **5730.2016.83**, sob a responsabilidade de **Alice Fernandes Alfieri**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **24/05/2016**.

O objetivo do projeto é identificar novos tipos de Papilomavírus bovinos (BPVs) por meio de técnicas moleculares em amostras provenientes de rebanhos do Paraná, Brasil. Para isso os animais serão contidos em canzais com alimentação durante a cirurgia e terão os membros posteriores imobilizados com o uso de cordas (peias). As hiperplasias características serão selecionadas previamente. Será feito a antisepsia ao redor das lesões a serem coletadas, anestesia local intra dérmica ao redor da verruga, excisão cirúrgica com uso de bisturi e pinça na base da lesão, estancamento de possíveis sangramentos com gaze estéril e aplicação de pomada cicatrizante/repelente. O proprietário se responsabilizará por aplicar a pomada até a completa cicatrização das feridas cirúrgicas. GI 1.

Vigência do Projeto	01/03/2015 a 28/02/2017
Espécie/linhagem	Bovino / SRD
Nº de animais	18
Peso/Idade	400kg / 1 a 7 anos
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Propriedade rural São José, Carlópolis-PR
Amostras a serem coletadas	Verrugas

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,


Profa. Dra. Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri

Coordenadora do Projeto

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Centro de Ciências Agrárias

Com cópia para Chefe do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Diretor(a) do Centro de Ciências Agrárias