



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

MARLISE POMPEO CLAUS

**IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DA DIVERSIDADE DO
PAPILOMAVÍRUS ASSOCIADO A LESÕES CUTÂNEAS EM
BOVINOS**

Londrina
2008

MARLISE POMPEO CLAUS

**IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DA DIVERSIDADE DO
PAPILOMAVÍRUS ASSOCIADO A LESÕES CUTÂNEAS EM
BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação,
em Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal (Área de
Concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2008

MARLISE POMPEO CLAUS

**IDENTIFICAÇÃO E ESTUDO DA DIVERSIDADE DO
PAPILOMAVÍRUS ASSOCIADO A LESÕES CUTÂNEAS EM
BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação,
em Ciência Animal da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal (Área de
Concentração: Sanidade Animal).

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros
Universidade do Vale do Itajaí

Dr. Laurival Antônio Vilas-Boas
Instituto Agronômico do Paraná - IAPAR

Prof. Dr. João Luís Garcia
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Júlio César de Freitas
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 29 de fevereiro de 2008.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação do Prof. Dr. Amauri Alcindo 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**

DEDICATÓRIA

"Para quem não tem porto não há vento favorável."

Minha mãe Edith, meu irmão Luís Fernando,
família, obrigada por serem meu porto, meu chão.

Meu pai amado Luiz, para sempre na minha vida...

Afonso, meu amor, por fazer parte da minha vida e sempre me dar o suporte necessário.

Família Claus, obrigada pelo apoio e amor durante todos esses anos.

Meus animais, Nenê, Tonha, Coconut, Véio, Ranulfo, Abrilina, Tobias e Gatitinho,
obrigada pela sua existência e por terem cruzado meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Nesses nove anos em Londrina só posso agradecer a Deus por ter tido a oportunidade de trilhar caminhos tão enriquecedores e conhecer pessoas capazes de tornar esse tempo tão gratificante. Todos os listados a seguir contribuíram de alguma forma para que eu pudesse alcançar esse objetivo e fazem parte de toda essa trajetória.

À família Alfieri pelo carinho com que me acolheu.

Ao professor e orientador Dr. Amauri A. Alfieri pela dedicação, exemplo, convívio e principalmente pela paciência de me orientar todo esse tempo, sempre respeitando esse meu jeito e tentando que eu "*keep the focus*". Muito obrigada pelas pressões e palavras ditas nas horas certas.

À professora Dr^a Alice Fernandes Alfieri pela amizade e consideração.

Aos membros da Comissão Examinadora na banca de qualificação e defesa por terem aceitado nosso convite e pelas excelentes contribuições.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado. Aos órgãos financiadores de todo esse trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela formação acadêmica científica.

Ao pessoal da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPPG).

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

Aos secretários Valdecir e Reinaldo. A secretária da pós-graduação Helenice pela disponibilidade sempre demonstrada.

Aos funcionários D. Cidinha, Maria José, Neusa e Zé A. "da micro", com vocês os corredores são uma alegre trajetória.

À professora Carmen Hilst e família, pela amizade e ajuda em momentos fundamentais.

À profa. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro, Coordenadora do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, do Departamento de Biologia Geral, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, por ter disponibilizado seu laboratório para a realização de todas as reações de seqüenciamento utilizadas neste trabalho.

Às incansáveis Daniele Sartori, Lara Ferracin, Francine de Paula e todos os demais membros de Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos da UEL, minha gratidão por ter sido tão bem recebida e assessorada.

Aos colegas de pós-graduação pelo excelente convívio.

Às técnicas de laboratório Kerlei Cristina Médici, Maria Yoshie e a "espetaculosa" Dalíria do Prado pela amizade, carinho e ajuda fundamental em todo esse período. Paulinha, minha amadinha, muito obrigada...

A todos que em algum momento eu tive a oportunidade de conviver na UEL e no laboratório de Laboratório de Virologia Animal, estagiários, bolsistas de iniciação científica, amigos e colegas. Obrigada pelas muitas risadas, viagens, festas, ajuda, amizade e companheirismo para que todo esse tempo fosse maravilhoso: Bruno Mazzer, Bruna Lima, Danilo Stipp, Eleine Anzai, Fábio Negrão, Francielle Gibson, Fabiana Almeida, Guilherme Braga, Jonas, Juliana Dias, Ju Galhardo, Kátia, Kledir (Kledis), Liza Ogawa, Lu Takemura, Marco Antônio, Michele, Sílvia Trapp, Sílvia Osaki, Rita Linares, Stella, Vanessa e Yuri.

Aos amigos do coração que tornam a vida essa experiência maravilhosa:

Aline Barry,

Alexandre e Andréa,

Celso e Lu,

Claudia Gebara,

Daniel Vivian (Frango), Flora
Kano,
Glei dos Anjos de Carvalho,
Melissa e Dudinha.

À Sheila Rezler Wosiacki, amiga querida que me "iniciou" no papilomavírus.

À Michele Lunardi, por ter sido fundamental em todos esses trabalhos e por ter feito da nossa parceria uma amizade maravilhosa.

À Dani Pilz, essa figura sempre presente no nosso coração e que nunca esquecemos.

À japa Betinha por ter sido minha primeira amiga aqui e por até hoje ser tão fundamental na minha vida... muito obrigada por todas as demonstrações de amor, amizade e confiança.

Aos amigos de uma vida toda que estão no paralelo 30°. Mesmo com a distância, nossos laços não são desfeitos. Obrigada por serem meu elo com a terra amada, por toda a energia enviada e por cada recepção que recebo toda vez que nos encontramos.

Aos amigos que tive a oportunidade de conhecer em Londrina e que contribuíram para que aqui eu me sentisse em casa e fosse feliz.

A todos os animais que fizeram e fazem parte da minha vida...

CLAUS, M.P. **Identificação e estudo da diversidade do papilomavírus associado a lesões cutâneas em bovinos.** 2008. 121f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

RESUMO

O papilomavírus (PV) é de ocorrência mundial e está envolvido no desenvolvimento de neoplasias epiteliais benignas e malignas em seres humanos e animais. A família *Papillomaviridae* apresenta grande diversidade, infecta uma ampla variedade de hospedeiros e, atualmente, é composta por 18 gêneros. O genoma do PV é constituído por DNA de fita dupla circular e a fita codificante contém 10 ORFs. A ORF L1, que codifica a principal proteína do capsídeo viral, é a mais conservada e tem sido utilizada para a identificação do tipo viral. A PCR realizada com *primers* genéricos para a amplificação de seqüências conservadas do gene L1 do PV, e posterior seqüenciamento dos amplicons, tem sido a técnica mais utilizada para a definição do tipo de PV presente em espécimes clínicos. O papilomavírus bovino (BPV) é classificado nos gêneros *Deltapapillomavirus* (BPV-1 e -2); *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 e -8) e *Xipapillomavirus* (BPV-3, -4, -6, -9, e -10). O BPV-7, até o momento, não está incluído em nenhum dos gêneros existentes. A papilomatose bovina está amplamente disseminada nos rebanhos bovinos de corte e, principalmente, de leite de todas as regiões geográficas brasileiras. Porém, os tipos de BPV, assim como as formas de infecção (singular, mista ou co-infecção), mais prevalentes nos rebanhos brasileiros ainda não foram determinados. O presente estudo teve como objetivo a determinação dos tipos virais e formas de infecção pelo BPV em amostras de papilomas cutâneos provenientes de rebanhos bovinos da região norte do Estado do Paraná. Utilizando a técnica da PCR, com os *primers* genéricos FAP59/FAP64, foram analisadas 22 amostras de papilomas cutâneos de 2 rebanhos de corte (n=16) e 2 de leite (n=6). Os produtos amplificados foram sequenciados para a realização de análises filogenéticas. Os *amplicons* de 4 amostras onde o tipo viral não pode ser determinado foram clonados. Análises filogenéticas foram realizadas a partir das seqüências obtidas dos clones. A PCR amplificou um produto com aproximadamente 480 pares de bases em todas as amostras de papilomas cutâneos avaliadas. O seqüenciamento direto dos *amplicons* e análises das seqüências identificaram quatro tipos de BPV (-1, -2, -6, e -8). O BPV-8, recentemente descrito na Ásia e Europa, foi identificado pela primeira vez no continente Americano, sugerindo a sua provável distribuição universal. Foram ainda identificados quatro supostos novos tipos de BPV ainda não descritos na literatura mundial. Os papilomas colhidos de diferentes regiões do corpo de 6 animais, sendo mais de um por animal, revelaram infecção mista caracterizada pela presença de dois tipos virais em cinco animais e três tipos virais em um animal. Adicionalmente, foi também identificado um caso de co-infecção. Em uma amostra de papiloma extraído do teto de uma vaca adulta, por meio de clonagem e seqüenciamento, foram identificados dois tipos virais distintos (BPV-1 e BPV-6) na mesma lesão. A infecção mista e a co-infecção, ainda não haviam sido descritas no Brasil. Os resultados desse estudo demonstram que, a exemplo do observado nas infecções pelo papilomavírus humano, a epidemiologia da papilomatose cutânea bovina no Brasil é bastante complexa envolvendo vários tipos virais e formas de infecção. Considerando a importância clínica e econômica da papilomatose bovina, estudos de caráter epidemiológico e molecular mais abrangente são necessários para o desenvolvimento e avaliação de medidas de controle e profilaxia da infecção nos rebanhos brasileiros.

Palavras-chave: Bovino. Papilomatose cutânea. Papilomavírus bovino. Análise filogenética.

CLAUS, M.P. **Identification and diversity study of papillomavirus associated to cutaneous lesions in bovines.** 121p. Thesis (Doctorate Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

ABSTRACT

Papillomaviruses (PV) has a worldwide distribution and is recognized as an etiologic agent associated with several benign and malignant epithelia lesions in human and animals. The *Papillomaviridae* family is a highly heterogeneous group of viruses, which has 18 genera, and likely occurs in most mammals and birds. The PV genome is circular double-stranded DNA and has 10 ORFs. The PCR assay with degenerate primers that amplifies relatively conserved region in the L1 ORF, followed by sequencing, have been allowed the identification of numerous PV types in human and other animal hosts. The bovine papillomavirus (BPV) are classified in the *Deltapapillomavirus* (BPV-1 and -2), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 and -8), *Xipapillomavirus* (BPV-3, -4, -6, -9, -10) genera and one unassigned genus (BPV-7). Bovine papillomatosis is extremely frequent throughout the Brazilian cattle beef and mainly, dairy herds. However, studies carried out for evaluated either the BPV typing, single or mix infection, and the BPV infection incidence is still infrequent. The aim of the present study is determinate the BPV types and way of infection (single, mix or co-infection) in papilloma specimens in cattle herds from north region of Paraná state. Were analyzed, by PCR assay with degenerate primers pair FAP59/FAP64, twenty-one papilloma specimens from two beef (n=16) and two dairy (n=6) herds. The PCR products were submitted a direct sequencing and the four amplicons which the prior analysis could be determined the BPV type, were cloning and the phylogenetic analysis was performed. PV DNA was detected in all DNA samples from the 22 papilloma specimens evaluated by using FAP PCR, resulting in bands with approximately 480 base pairs. Four BPV types were identified (BPV-1, -2, -6, and -8). The BPV-8, recently described in Asia and Europe, was the first identified in the American continent, suggests, probably, a worldwide distribution. In addition, four putative new BPV types could be identified for the first time. In six animals, which were collected, in distinctly regions of body, more than one papilloma, could be observed mix infection with two (5 animals) or three (one animal) different BPV types. Moreover, we also identified a case of co-infection. In a teat papilloma from adult cow, by cloning and sequencing, were identified in the same lesion, the BPV-1 and BPV-6. Is the first report of these two distinctly forms of BPV infection in Brazil. Our results shown that the papillomavirus infection can be so frequent in bovine as in human beings. In addition, to the epidemiological importance, molecular studies based on the identification of BPV types are necessary to define the appropriate control and prophylaxis measures.

Keywords: Bovine. Cutaneous papillomatosis. Bovine papillomavirus. Phylogenetic analysis.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

- Figura 1** – Desenho esquemático do genoma do papilomavírus bovino tipo 1 29
- Figura 2** – Desenho esquemático linear do genoma do papilomavírus bovino tipo 2, disponível no GenBank (NC 001521) 29
- Figura 3** – Desenho esquemático da infecção pelo papilomavírus em epitélio cutâneo..... 30

Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds

- Figura 1** – (a) Neighbour-joining phylogenetic tree reconstructed with FAP sequences of BPV/BR-UEL2 to -5, and 39 human and animal PVs classified in genus *Alphapapillomavirus* to *Sigmapapillomavirus*. (b) Phylogenetic tree with FAP sequences of previously described BPV types, and putative new BPV types, including those of BPV/BR-UEL2 to -5. The tree is divided into the previously determined genera *Deltapapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus*, *Xipapillomavirus*, and an unassigned PV genus (BPV-7). The numbers in internal nodes represent the bootstrap support values determined for 1000 replicates. The BPV/BR-UEL2, -3, -4, and -5 are indicated by shading 57

The new bovine papillomavirus type 8, recently described in Asia and Europe, also found in the American continent

- Figura 1** – Partial L1 sequence of BPV derived from the skin papilloma of a cow in a Brazilian beef cattle herd compared to the sequence of BPV-8 (accession number EF635385). Asterisks indicate identical bases 71

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Revisão de literatura

Quadro 1 – Funções das proteínas codificadas pelo papilomavírus bovino tipo 1 (NC 001522). Fonte: Alfieri et al. (2008)	31
Quadro 2 – Medidas terapêuticas preconizadas para a papilomatose cutânea bovina	32
Quadro 3 – <i>Primers</i> utilizados na reação em cadeia da polimerase para a identificação e análise filogenética do papilomavírus bovino associado a lesões cutâneas.....	32

Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds

Table 1 – Some lesions characteristics and the highest similarity percentage of Brazilian putative new bovine papillomavirus types with the BPV-1 to 10.....	58
---	----

Bovine papillomavirus mix-infection in cattle afflicted by cutaneous papillomatosis

Table 1 – Distribution of bovine papillomavirus types found in mix infections.....	79
---	----

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	13
Introdução.....	13
Papilomavírus.....	14
<i>Estrutura e organização genômica</i>	14
<i>Nomenclatura e classificação</i>	16
<i>Ciclo replicativo e patogenia</i>	17
<i>Heterogeneidade e evolução do PV</i>	19
Enfermidades associadas ao PV em bovinos.....	21
<i>Papilomatose cutânea</i>	21
<i>Tumores do trato digestório superior e bexiga</i>	25
Diagnóstico do PV.....	25
Imunoprofilaxia.....	27
Perspectivas e considerações finais.....	27
Referências.....	33
2 OBJETIVOS	42
2.1 OBJETIVO GERAL.....	42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	43
3.1 IDENTIFICATION OF UNREPORTED PUTATIVE NEW BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPES IN BRAZILIAN CATTLE HERDS.....	43
Abstract.....	44
3.1.1 Introduction.....	45
3.1.2 Materials and Methods.....	46
3.1.2.1 Papillomas.....	46
3.1.2.2 DNA extraction.....	47
3.1.2.3 PCR assay.....	47
3.1.2.4 Sequence analysis.....	48
3.1.2.5 Cloning.....	48
3.1.2.6 Phylogenetic analysis.....	49
3.1.3 Results3.....	50

3.1.4 Discussion.....	50
References	53
3.2 THE NEW BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPE 8, RECENTLY DESCRIBED IN ASIA AND EUROPE, ALSO FOUND IN THE AMERICAN CONTINENT	59
Abstract.....	60
References	67
3.3 BOVINE PAPILLOMAVIRUS MIX-INFECTION IN CATTLE AFFLICTED BY CUTANEOUS PAPILLOMATOSIS	72
Abstract.....	73
References	80
3.4 A BOVINE TEAT PAPILLOMA SPECIMEN HARBORING TWO TYPES OF THE BOVINE PAPILLOMAVIRUS.....	84
Abstract.....	85
References	91
4 CONCLUSÕES.....	95
APÊNDICES	96
APÊNDICE A – Lista de reagentes.....	97
APÊNDICE B – Soluções e tampões	99
APÊNDICE C – Protocolo de técnicas	101
ANEXOS	107
ANEXO A – Normas de publicação no periódico Veterinary Microbiology	108
ANEXO B – Normas de publicação no periódico Pesquisa Veterinária Brasileira	116
ANEXO C – Sequências alinhadas do BPV-1 a BPV-10, prováveis novos tipos de BPV (BAA1 a -4; BAPV3, -4, -5, -7, 8, -9 e -10) e isolados brasileiros (BPV/BR-UEL2 a -UEL5).....	119

1 REVISÃO DE LITERATURA

Introdução

Nas últimas duas décadas o interesse científico pelo papilomavírus (PV) tem aumentado consideravelmente, pois vários tipos de PV integram o mais importante grupo de viroses associadas a neoplasias benignas e malignas em seres humanos. Atualmente, mais de 100 tipos de papilomavírus humano (HPV) são conhecidos. Adicionalmente, por meio de seqüências parciais de nucleotídeos, há evidências da existência de mais 100 outros tipos virais, os quais são provisoriamente descritos como "supostos novos tipos" (de VILLIERS et al., 2004; BERNARD, 2005; CHEN et al., 2007).

Embora a ocorrência de papilomas cutâneos em humanos seja descrita há séculos, somente na década de 1980 os estudos moleculares permitiram descrever o primeiro HPV, assim como também o primeiro papilomavírus bovino (BPV) (CHEN et al., 1982; SEEDORF et al., 1985; BOSCH et al., 2002). O câncer cervical, a segunda causa de mortalidade em mulheres, é o único tipo de câncer em seres humanos com etiologia viral e comprovadamente atribuída à infecção pelo HPV (FRAZER, 2004; BURK; DeSALLE, 2006).

Os estudos relativos à infecção pelo PV em animais foram iniciados em 1898 por M'Fadycan e Hobday que descreveram a etiologia infecciosa do papilomavírus oral canino (COPV). Entretanto, somente em 1933 o primeiro PV animal foi identificado por Richard Shope, estudando o *cottontail rabbitpapillomavirus* (CRPV). Esse foi um importante modelo para o desenvolvimento de estudos sobre a oncogênese viral.

Devido às características morfológicas e estruturais comuns ao gênero poliomavirus, como partículas virais não-envelopadas, capsídeo icosaédrico e genoma constituído por DNA fita dupla, até o ano 2000 o PV estava na família *Papovaviridae* (HOWLEY; LOWY, 2001). Porém, estudos moleculares evidenciaram diferenças significativas tanto no tamanho do genoma viral, de aproximadamente 5 kb para o poliomavírus e 8 kb para o PV, quanto à organização genômica e seqüência de nucleotídeos, onde se observa somente um pequeno segmento homólogo no gene E1 (DANOS et al., 1982; BERNARD, 2005). Baseados nessas evidências, o 7º Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) reclassificou o PV na família *Papillomaviridae*, a qual foi constituída por um

único gênero denominado *papillomavirus*. Em 2004, a reunião do 8º ICTV propôs a redistribuição dos 118 tipos de PV conhecidos na época em 18 gêneros (de VILLIERS et al., 2004; OGAWA et al., 2007).

Cinco desses gêneros são compostos exclusivamente por tipos de HPV e papilomavírus identificados em algumas espécies de primatas não-humanos (macacos e chimpanzés). Todos os outros gêneros são formados por PV identificados em mamíferos e aves. Como a classificação do PV está diretamente relacionada à sua espécie hospedeira, a identificação de um papilomavírus em espécies ainda não avaliadas, normalmente forma um novo gênero. O número de gêneros deve ser expandido em breve uma vez que, até o momento, somente um número muito pequeno de mamíferos e aves foram investigados quanto a ocorrência da infecção relacionada a esse vírus (BERNARD, 2005).

Papilomavírus (PV)

Estrutura e organização genômica

O PV constitui um grupo de pequenos oncovírus, não-envelopados, com 52-55 nm de diâmetro. O capsídio viral é composto de 72 capsômeros dispostos de forma icosaédrica. Cada capsômero é composto pelas proteínas L1 e L2. O ácido nucléico é constituído por uma molécula única de DNA fita dupla circular, não segmentado, com aproximadamente 7,3 kb a 8 kb. A massa molecular do ácido nucleico é de 5×10^6 dalton, que representa 12% do virion, e a porcentagem média de guanina e citosina é de aproximadamente 42%. A partícula viral é resistente às condições do meio ambiente e a solventes lipídicos como o éter e o clorofórmio (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 2000; HOWLEY; LOWY, 2001).

O genoma do PV possui seqüências conservadas, que constituem as regiões denominadas quadro aberto de leitura (*open reading frames* - ORFs), localizadas em uma das fitas do DNA, indicando que apenas uma fita é utilizada como molde para a transcrição das proteínas virais. A fita codificante contém cerca de 10 ORFs, classificadas em dois segmentos principais conforme a fase de leitura. O segmento inicial (E - *early*) contém 8 ORFs e codifica as proteínas necessárias para a replicação e a transcrição do DNA viral. Este segmento representa 45% do genoma e é expresso em células recém infectadas, em infecções não-

produtivas e em células transformadas. O segmento tardio (L - *late*), que representa 40% do genoma, é responsável pela codificação das proteínas do capsídio viral (L1 e L2) que são expressas somente nas fases finais da replicação e encontradas somente nas células com infecção produtiva. Entre os segmentos E e L, localiza-se a LCR (*long control región*) constituída por 500 a 1.000 pares de bases (pb) e representa 15% do genoma viral. Apesar dessa região não codificar proteínas, é constituída por elementos reguladores da replicação e transcrição e por promotores responsáveis pelos fatores celulares, além de conter o ponto da origem (*ori*) da replicação (BAKER; HOWLEY, 1987; CAMPO, 1997; HOWLEY; LOWY, 2001; CAMPO, 2002) (figuras 1 e 2).

Os genes E1 e E2 estão envolvidos na regulação da transcrição e na replicação do vírus. Os genes E5, E6 e E7 apresentam regulação negativa dos genes E1 e E2 e, na ausência destes genes reguladores, os produtos de E6 e E7 são oncogenes potentes, suficientes para a transformação de algumas culturas de células. O gene E5 é altamente conservado entre os papilomavírus indutores de fibropapilomas nos seus hospedeiros naturais, além de ter a capacidade de induzir tumores fibroblásticos em hamsters. Provavelmente, o gene E5 é o responsável pela proliferação dos fibroblastos nos fibropapilomas (HOWLEY; LOWY, 2001).

Em alguns tipos de PV nem todos os oncogenes estão presentes no genoma viral. No BPV-7, descrito em 2007 por Ogawa e colaboradores o gene E5 não foi identificado. A ORF E6 está ausente no BPV-3, -4 e -6, assim como em PV de algumas espécies de aves silvestres (JACKSON et al., 1991; TERAÍ et al., 2002). Recentemente, foram descritos os primeiros HPV (HPV-101 e HPV-103) que não apresentam o gene E6. O papilomavírus do *Phocoena spinipinnis* (PsPV), causador de verrugas genitais nesse pequeno cetáceo, possui a ORF E6 mas não apresenta a proteína E7 identificável. Isso tem sugerido que as funções de E6 e E7 não são requeridas por esse vírus, ou são realizadas por outras proteínas virais ou do próprio hospedeiro. Uma hipótese relevante seria a de que um rearranjo genômico, ocorrido nos ancestrais virais, possa ter contribuído para a evolução de alguns tipos de PV sem os principais oncogenes virais E6 ou E7. Esses genes também estão envolvidos na adaptação do genoma do PV a vários hospedeiros e tecidos (CHEN et al., 2007). Em contraste, as ORFs E1, E2, L1 e L2 são bem conservadas em todos os tipos de PV e seus produtos são proteínas essenciais para o ciclo de replicação viral (de VILLIERS et al., 2004). As funções e o tamanho das proteínas codificadas pelo BPV-1 estão detalhadas na quadro 1.

O estado físico do genoma do PV pode se apresentar sob duas formas, conforme o tipo de lesão associada à infecção. Nas lesões benignas, o genoma está presente

em múltiplas cópias sob a forma episomal, ou seja, não integrado ao genoma da célula hospedeira. Nas lesões malignas, o genoma do PV pode se integrar ao genoma da célula hospedeira formando uma interação estável. O vírus integrado é incapaz de completar o ciclo replicativo, visto que os genes essenciais para o término da replicação estão interrompidos. Quando o fenômeno da integração ocorre, o genoma circular do papilomavírus é rompido, geralmente, entre os genes E1 e E2. O gene E2 codifica uma proteína que regula a transcrição das proteínas E6 e E7, com sua inativação ocorre um aumento da expressão destes genes (CULLEN et al., 1991).

Nomenclatura e classificação

A dificuldade de propagação do PV em linhagens celulares comumente utilizadas em virologia impediu, durante muito tempo, que fossem realizados progressos nos estudos das funções virais e avanços na taxonomia viral. Nas últimas décadas, com o desenvolvimento de métodos moleculares de estudos, evidenciou-se expansão considerável nos conhecimentos relativos à taxonomia do PV. Inicialmente, os estudos foram fundamentados em técnicas de hibridação e em padrões de restrição, que por meio de um sistema de algoritmos filogenéticos comparavam tanto o genoma completo quanto segmentos subgenômicos (de VILLIERS et al., 2004).

De acordo com o ICTV, a atual classificação do PV teve o objetivo de estabelecer a relação entre os tipos de PV; comparar o termo "tipo" de PV nos padrões taxonômicos "espécie" e "gênero"; e investigar a relação entre a classificação taxonômica e as propriedades biológicas e patológicas. Desta forma, a família *Papillomaviridae* foi avaliada em base filogenética e, atualmente, é composta por 18 gêneros (de VILLIERS et al., 2004; OGAWA et al., 2007).

O BPV é classificado, de acordo com a similaridade das seqüências de nucleotídeos, nos gêneros: *Deltapapillomavirus* (BPV-1 e -2); *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 e -8) e *Xipapillomavirus* (BPV-3, -4, -6, -9, e -10) (HATAMA et al., 2008). Análises filogenéticas com base na seqüência completa da ORF L1 sugerem que o BPV-7 deve ser classificado em um novo gênero ainda não definido (OGAWA et al., 2007).

A árvore filogenética distribui os PV de origem humana e animal em cinco supergrupos, denominados A, B, C, D e E. O supergrupo A compreende os HPV

denominados genitais e os principais tipos (HPV-16, -18) envolvidos em lesões mucosas que podem progredir para neoplasias de alto grau e câncer. O supergrupo B é subdividido em B1 e B2 e agrupa os HPV isolados de endermodisplasia verrucosa (EV). No supergrupo C e D estão alocados PV de diversas espécies animais, incluindo a bovina. Os outros PV estão alocados no supergrupo E que inclui tanto HPV quanto outros PV animais causadores de lesões cutâneas (CHAN et al., 1995; DOORBAR, 2005).

Os papilomavírus são identificados pela abreviatura PV, juntamente com uma ou duas letras indicando a espécie hospedeira. Os tipos de PV seguem a ordem numérica de descrição. Nos últimos 20 anos o *Reference Center for Papillomaviruses at the German Cancer Research Center* tem sido o responsável pelo processo de registro de HPV. Como a ORF L1 é a mais conservada no genoma do PV esse fragmento tem sido utilizado para a identificação de novos tipos virais. Um novo tipo é reconhecido quando tiver seu genoma completo clonado e o seqüenciamento da L1 demonstrar diferença de identidade de nucleotídeos superior a 10%, quando comparado a todos os outros PV já descritos naquela espécie. Diferenças entre 2% e 10% definem um subtipo e inferiores a 2% caracterizam uma variante viral. Quando somente uma parte do gene L1 é amplificada e avaliada, sugerindo essas diferenças, o isolado é denominado de suposto novo tipo (de VILLIERS et al., 2004; BERNARD 2005). Esse critério, originalmente estabelecido para o HPV, tem sido extrapolado para outras espécies animais como a bovina, uma vez que não existe padronização na taxonomia dos PV isolados em animais.

Desde 2002, vários supostos novos tipos de BPV têm sido identificados e, em apenas um ano, quatro novos tipos virais (BPV-7, -8, -9,-10) tiveram os seus genomas completos sequenciados e disponibilizados em bases públicas de dados (OGAWA et al., 2007; TOMITA et al., 2007; HATAMA et al., 2008).

Ciclo replicativo e patogenicidade

O papilomavírus é capaz de infectar diversos tipos celulares do organismo do hospedeiro. No entanto, o ciclo completo de replicação viral está diretamente relacionado ao processo de divisão e diferenciação das células-alvo do epitélio. À medida que ocorre a diferenciação celular nas células infectadas o genoma viral vai sendo amplificado, e a montagem do virion se estabelece nas camadas mais superficiais do epitélio. Essa

característica dificulta a propagação *in vitro* do PV, limitando a obtenção de quantidades razoáveis de vírus somente a partir das lesões (figura 3) (CAMPO, 1997).

A infecção da camada celular basal ocorre por inoculação cutânea direta, por meio de soluções de continuidade da pele ou por microabrasão. Após a entrada na célula o vírus é transportado em fagossomos e perde o capsídeo protéico até a entrada no núcleo, local onde ocorre a replicação viral (FRAZER, 2004). O PV presente nas células basais do epitélio estimula a divisão celular e ocasiona o crescimento excessivo dessas células. Com isso, são formados os papilomas, ou verrugas, que são lesões benignas que podem regredir naturalmente sem ocasionar problemas clínicos mais graves (HOWLEY; LOWY, 2001; CAMPO, 1997; SCHUCH, 1998).

O papilomavírus pode também ser encontrado em células polimorfonucleadas periféricas, no entanto, não existem evidências da sua multiplicação nessas células (CAMPO, 1997; SANTOS et al., 1998). Esta observação é importante pela implicação que pode ter na patogênese da infecção, considerando que a corrente sanguínea possa carrear o vírus para diferentes tecidos.

Estudos têm demonstrado que vários tipos de HPV podem ser aparentemente, não-patogênicos e comportarem-se como agentes comensais da pele saudável de seres humanos (FORSLUND et al., 1999; ANTONSSON et al., 2000). O mesmo ocorre em várias espécies animais, incluindo a bovina, onde tanto papilomavírus anteriormente descritos quanto supostos novos tipos virais têm sido isolados a partir de *swabs* da pele normal (ANTONSSON; HANSSON, 2002; OGAWA et al., 2004; ANTONSSON; MC MILLAN, 2006).

O PV é espécie-específico, e está relacionado com lesões no epitélio cutâneo e mucoso de várias espécies de mamíferos, aves e répteis (DOOBAR, 2005). Estudos de fibropapillomas em tartarugas marinhas relacionam a presença do PV em associação a fatores ambientais, como a poluição das águas (FOLEY et al., 2005). As infecções entre diferentes espécies hospedeiras são raras, mas não há infecção produtiva na segunda espécie. O sarcóide, que é o tumor de pele mais comumente relatado em equinos e muares, está associado à infecção desses animais pelo BPV-1 e BPV-2 (CHAMBERS et al., 2003).

Alguns aspectos relativos à infecção como o modo de transmissão, o desenvolvimento da infecção persistente, o *clearance* viral e a interação com o sistema imune, ainda são apenas parcialmente conhecidos (MOLIJN et al., 2005).

Heterogeneidade e evolução do papilomavírus

A família *Papillomaviridae* demonstra alta variabilidade, sendo um modelo ideal para o estudo da evolução de vírus DNA. Seus genes são homólogos, embora tenham funções e seqüências diferentes. Estudos com base nestas similaridades dos genes têm sido utilizados na nomenclatura, taxonomia e filogenia do PV (CHAN et al., 1995; de VILLIERS et al., 2004).

A partir do conhecimento do envolvimento do PV em cânceres em animais e em seres humanos, os estudos referentes a esses vírus têm apresentado um incremento substancial. A identificação de lesões relacionadas ao PV e o seqüenciamento do genoma viral disponibilizados para estudos filogenéticos e taxonômicos têm possibilitado maior compreensão do processo evolutivo do PV (CHAN et al., 1992).

Desde a primeira reconstrução filogenética, baseada em domínios conservados do gene E1 de nove papilomavírus (GIRI; DANOS, 1986), o número de seqüências de genomas completos do PV tem aumentando constantemente e, atualmente (dezembro, 2007), está próximo de 241 depósitos em bases públicas de dados. Entretanto, as únicas espécies representadas com um número significativo de PV, identificados até o momento, compreendem a humana, algumas espécies de macacos e a bovina.

O amplo espectro de ferramentas de bioinformática disponibilizados nos últimos anos tem possibilitado análises do genoma completo, ou pelo menos o alinhamento de regiões, ampliando a possibilidade de determinação de novos tipos virais (GOTTSCHLING et al., 2007).

Vários aspectos a respeito da evolução do PV necessitam maior entendimento, o que ajudaria explicar se algumas propriedades moleculares podem relacionar cada tipo de PV a um hospedeiro ou a um tecido em particular. Outra questão é o fato de diversos tipos de PV estarem envolvidos no mesmo hospedeiro, com tecidos alvos e patologias similares (CHAN et al., 1997).

As análises filogenéticas que utilizam seqüências de nucleotídeos para a reconstrução das relações evolucionárias podem ser representadas graficamente nas árvores. A distribuição na árvore pode refletir a relação dos isolados com seus respectivos hospedeiros (ONG et al., 1993; CHAN et al., 1995).

Os PV, por serem vírus de DNA de fita dupla, apresentam taxa de evolução lenta, uma vez que utilizam para a replicação as mesmas enzimas presentes no núcleo da

célula hospedeira. Além disso, a replicação viral está vinculada à divisão celular do epitélio infectado, apresentando taxa de divisão similar à da linhagem germinativa da célula mãe (SHIMMIN et al., 1993). A epidemiologia molecular de alguns tipos de HPV sugere que esses tipos já existiam desde o tempo em que os seres humanos foram originados como espécie, há centenas de milhares de anos. Este dado permite estimar que a diversificação do genoma do HPV ocorra no máximo a uma taxa de 0,25% durante um período de 10.000 a 20.000 anos. Pode-se estimar que distâncias que excedam o critério de 10% para tipo têm envolvido períodos superiores a 200.000 a 1.000.000 de anos (ONG et al., 1993; BERNARD et al., 1994; CHAN et al., 1997).

Todos os mamíferos e, provavelmente, muitos outros vertebrados albergam papilomavírus. Porém, existe uma distância evolucionária entre o PV de mamíferos e o PV de diferentes classes de hospedeiros aviários. Possivelmente, há uma associação antiga entre o vírus e o hospedeiro, explicada pela baixa taxa de evolução, esporádica transmissão interespecie, além da especificidade pelo hospedeiro. Conseqüentemente, a evolução pode ser estudada a partir da correlação com distintas variáveis biológicas, como a espécie hospedeira, ou pelo tropismo preferencial da maioria dos HPV por uma gama de epitélios e tipos celulares. No caso dos seres humanos e de alguns animais ungulados existe uma grande variedade de tipos virais relacionados que induzem diferentes patologias (HO et al., 1993; CHAN et al., 1997).

A especificidade pelo hospedeiro e a natureza benigna da maioria das infecções pelo PV sugerem que esses vírus sejam microrganismos extremamente bem adaptados. Nesses casos, a pressão de seleção exercida pelo hospedeiro é a força dominante dessa relação. A evolução do PV, provavelmente, é dominada pela seleção unilateral do hospedeiro, chamada de evolução seqüencial. Esse termo parece ser mais apropriado que co-evolução, que descreve a pressão seletiva mútua entre o hospedeiro e o parasita, a qual não parece existir no caso do PV e seus hospedeiros (CHAN et al., 1995).

Uma questão debatida entre os taxonomistas de PV é se o evento de recombinação teve destaque na história evolucionária desses vírus. Vários estudos indicaram que a evolução do PV ocorreu na ausência de uma recombinação recente. Entretanto, outras análises filogenéticas, considerando diferentes partes do mesmo genoma, apontaram algumas diferenças entre os ramos internos das árvores reconstruídas, evidenciando a suspeita que pode ter ocorrido recombinação, embora pouco freqüente, entre as linhagens ancestrais de PV (CHAN et al., 1992b; HALPERN, 2000; BRAVO; ALONSO, 2004; SCHIFFMAN et al., 2005).

Um aspecto abordado em vários estudos é a frequência com que pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) são co-infectados com uma ampla variedade de tipos de HPV (LEVI et al., 2002; HAAS et al., 2005). O comprometimento imune observado nesses pacientes pode facilitar a geração e a emergência de HPV recombinantes, alguns dos quais podem adquirir novas propriedades patogênicas. A recombinação é um importante mecanismo evolucionário e a evidência de viabilidade desse evento ocorrer em PV pode ampliar o entendimento do processo evolutivo dessa família viral (VARSANI et al., 2006).

Enfermidades associadas ao PV em bovinos

Papilomatose cutânea

Os papilomas cutâneos são proliferações benignas, de natureza fibroepitelial, localizadas na pele e mucosas e comumente encontradas em bovinos. A enfermidade é mais observada em animais jovens, com até dois anos de idade, embora também possa comprometer animais de todas as faixas etárias (CAMPO et al., 1994; JELINEK; TACHEZY, 2005). A papilomatose cutânea é uma enfermidade cosmopolita, popularmente conhecida, como papiloma, verruga ou figueira.

As lesões podem apresentar aspectos variados e são classificadas macroscopicamente em filiformes, na forma típica pedunculada, e nas formas atípicas, planas e engastadas. Os papilomas do tipo pedunculado apresentam aspecto verrucoso, sugerindo a forma de "couve-flor". A base de inserção pode ser ampla ou estreita, com a coloração variando do cinza ao preto e desprovida de pêlos. As lesões, dependendo do número, podem formar uma grande massa e comprometer extensas áreas da pele (GUPTA et al., 1989; SMITH et al., 1995).

Os papilomas planos são achatados, com base ampla, de coloração esbranquiçada e com presença de pêlos. Podem se apresentar de forma isolada ou agrupada e são de difícil remoção. Os papilomas planos atípicos, na forma engastada, apresentam como principais características serem globosos, encapsulados, rugosos e de coloração acinzentada.

Embora somente 20% do papiloma esteja na superfície da pele, esse tipo de papiloma pode ser facilmente removido (GUPTA et al., 1989; SMITH et al., 1995).

A observação microscópica dos papilomas revela a presença de acantose e hiperqueratose. Nos papilomas pedunculados, as cristas interpapilares penetram profundamente no interior da derme, ao contrário dos planos onde o tecido da derme sofre pouca ou nenhuma fibroplasia. Achados histológicos relatados nos dois tipos de papilomas incluem: i) presença de vesículas intracitoplasmáticas (degeneração hidrópica) em células do estrato espinhoso; ii) aumento da quantidade de granulações basofílicas, intracitoplasmáticas e intranucleares no estrato granuloso; iii) inclusões eosinofílicas intranucleares e acidofílicas intracitoplasmáticas (GUPTA et al., 1989; SANTIN; BRITO, 2004).

Devido à facilidade de transmissão do agente, a papilomatose pode se tornar um grave problema econômico nas explorações de bovinos de corte e, principalmente, em rebanhos leiteiros. Várias práticas de manejo podem colaborar na disseminação e perpetuação do vírus no rebanho. A transmissão ocorre por contado direto (animal-animal) ou indireto, envolvendo injúrias provocadas por arame farpado, agulhas, cercas, cordas, insetos hematófagos, bem como o uso comum de material de descorna, ordenha, tatuagem e castração. Os locais afetados com maior frequência são aqueles mais sujeitos a traumas, como o pescoço, cabeça e tetos (RADOSTITIS et al., 2000).

Os animais acometidos apresentam redução na qualidade do couro e depreciação do seu valor de comercialização, além de limitar a participação em feiras e exposições agropecuárias. Os machos com lesões localizadas no aparelho urogenital podem apresentar dificuldades na monta, devido à dor, comprometendo o seu desempenho reprodutivo. A ocorrência de miíases, decorrentes do sangramento das lesões, pode levar a infecções secundárias cujo tratamento pode aumentar, indiretamente, os custos da infecção.

Os papilomas localizados no aparelho mamário, tetos e úbere, podem dificultar tanto o aleitamento do bezerro quanto a ordenha. Pode ser observada ainda maior predisposição à mastite, subclínica ou mesmo clínica, ocasionada pela ordenha incompleta (leite residual) ou por contaminação dos papilomas que predisõem à mastite ascendente. Em rebanhos com ordenha mecânica os papilomas podem ocasionar falhas no ajuste das teteiras, ou mesmo a sua queda durante a ordenha. Estas deformações pode levar a entrada de ar no sistema o que também pode predispor à mastite. Em casos avançados, onde todo o teto pode estar comprometido, pode ser necessário o descarte precoce do animal.

A maior susceptibilidade dos animais jovens a infecção é devido à falta de reconhecimento do patógeno pelo sistema imune. Após a primo-infecção os animais tornam-

se menos suscetíveis, ou mesmo resistentes a novas infecções. Os tumores geralmente regredem em até um ano. O sistema imune desempenha importante função na resolução e/ou gravidade das lesões, sendo que o processo de regressão dos tumores envolve muito mais a imunidade celular do que a imunidade humoral (CAMPO et al., 1994; JELINEK; TACHEZY, 2005; NICHOLS; STANLEY, 2000).

A regressão espontânea de papilomas tem sido observada tanto em seres humanos quanto em animais e está diretamente relacionada ao desempenho do sistema imune. Na avaliação histológica de lesões em fase de regressão é observada acentuada infiltração linfocitária, tanto na derme quanto no epitélio. A caracterização fenotípica desses linfócitos revela a presença de linfócitos CD4+ e CD8 + (KNOWLES et al., 1996).

Uma variedade de tratamentos para a papilomatose cutânea tem sido sugerida. Entretanto, a eficiência da imensa maioria desses tratamentos ainda não foi adequadamente comprovada e os resultados apresentados são contraditórios e deficientes, exigindo a constante repetição dos mesmos. A avaliação desses tratamentos também é relativa, uma vez que a enfermidade é autolimitante e o curso da enfermidade pode variar de acordo com cada animal. O quadro 2 apresenta algumas das medidas terapêuticas mais citadas preconizadas para a resolução das lesões. Outras formas de tratamento, quando a extensão das lesões permite, incluem a cauterização e a excisão cirúrgica.

De um modo geral, os estudos envolvendo as diferentes formas de tratamento da papilomatose cutânea, demonstram resposta mais eficiente no controle dos papilomas pedunculados quando comparados aos de aspecto plano. Embora a porcentagem de "cura" demonstrada pelos tratamentos seja bastante variada, a autovacina é um tratamento terapêutico que merece destaque. As variadas taxas de sucesso obtidas com sua utilização podem ser decorrentes de alguns aspectos relacionados à sua produção e características biológicas do PV. Por se tratar de um imunógeno inativado, as autovacinas estimulam de forma mais eficiente a imunidade humoral. Os diferentes tipos de PV, em geral, não apresentam imunidade cruzada entre si, o que pode influenciar na resposta imune caso o material biológico utilizado em sua elaboração não contemple os tipos virais presentes no animal que irá receber o imunógeno (JARRET et al., 1990; OLSON et al., 1992; NICHOLS; STANLEY, 2000).

No Brasil, independentemente do nível de tecnicidade da exploração pecuária, a infecção pelo BPV está amplamente disseminada em rebanhos bovino de corte e, principalmente, nos de aptidão leiteira. Apesar da alta frequência da infecção, a determinação dos tipos virais circulantes ainda é esporádica (CLAUS et al., 2007).

Os dez tipos virais atualmente descritos estão envolvidos na etiologia das lesões, embora o BPV-4 só tenha sido descrito ocasionando papilomatose cutânea uma única vez (BLOCH et al., 1996). A maioria dos supostos novos tipos virais também foi isolada em lesões cutâneas, principalmente em tetos (OGAWA et al., 2004).

De acordo com as características clínicas, anatomopatológicas e moleculares, os BPV-1 a -6 foram classificados em subgrupo A (BPV-1, -2 e -5), constituído por vírus que induzem a proliferação fibroblástica e subgrupo B (BPV-3, -4 e -6), que compreendem os vírus epiteliotrópicos (CAMPO, 1995). Essa distribuição foi baseada na premissa de que cada tipo de BPV tenha especificidade por algum tecido, apresente determinado aspecto macroscópico, e tenha localização anatômica específica no corpo do animal afetado. Os recentes estudos moleculares, envolvendo a identificação do BPV presente em lesões cutâneas, sugerem que esse critério de classificação, não deva ser totalmente seguido. A diversidade viral do PV em seres humanos já está comprovada e alguns tipos virais já foram encontrados em outros locais além do primariamente identificado (DOORBAR, 2005).

Em trabalhos preliminares, o nosso grupo de estudo identificou a forma filiforme de papiloma, freqüentemente relacionado ao BPV tipo 5, em outros tipos virais que não o BPV-5. No teto, onde a infecção pelo BPV-6 é a mais relatada, também já foram identificados outros tipos virais como os recentemente descritos BPV-7, -8, -9 e -10, além de outros supostos novos tipos que ainda não tiveram o genoma completo seqüenciado (OGAWA et al., 2004, 2007; CLAUS et al., 2007; HATAMA et al., 2008).

Com base nessas constatações, observa-se que apenas a subdivisão do BPV em subgrupos, vinculados ao tipo e localização das lesões, não deve ser o único critério a ser considerado para a definição do tipo viral infectante. Outros critérios que envolvem análises moleculares, e em particular aqueles relacionados à definição da seqüência do gene L1 do BPV, como ocorrem em HPV, devem ser avaliados para a definição do tipo viral envolvido em casos clínicos de papilomatose cutânea. Além da importância epidemiológica, a definição do tipo de BPV presente em casos de papilomatose cutânea, poderá apresentar reflexos nos métodos de controle e profilaxia, principalmente com a utilização da autovacina.

Tumores do trato digestório superior e da bexiga

Evidências epidemiológicas demonstram que algumas lesões benignas podem sofrer transformação maligna em resposta a fatores genéticos ou ambientais (HOPKINS, 1986). Nesse contexto, a hematúria enzoótica bovina (HE) e o tumor do trato digestório superior em bovinos são enfermidades relacionadas à associação entre a infecção pelo BPV e a ingestão prolongada da planta samambaia (*Pteridium aquilinum*) (CAMPO et al., 1992; CAMPO, 1997).

O envolvimento do BPV-2 na etiologia da HE tem sido descrito por vários autores. A HE apresenta distribuição mundial, com prevalência variada em áreas endêmicas. A enfermidade caracteriza-se pelo longo período de evolução e pela apresentação clínica representada por hematúria intermitente, emagrecimento progressivo e morte. A mucosa vesical apresenta lesões hemorrágicas e hiperplásicas que, com frequência, evoluem para neoplasias (CAMPO et al., 1992, BORZACCHIELLO et al., 2003; WOSIACKI et al., 2005).

Em bovinos, a infecção pelo BPV-4 pode resultar em papilomas do trato digestório superior que podem progredir para o câncer quando associada aos compostos tóxicos presentes na samambaia (CAMPO, 2002; BORZACCHIELLO et al., 2003). No Brasil, Gava e colaboradores (2002), no Estado de Santa Catarina, demonstraram que as neoplasias decorrentes da infecção pelo BPV culminam com a morte de aproximadamente 1% do rebanho do estado por ano. Aos prejuízos econômicos somam-se as perdas indiretas decorrentes do descarte precoce de animais de reprodução e a queda na produtividade.

Diagnóstico do PV

O PV não pode ser amplificado em cultura de células convencionais e os testes sorológicos têm acurácia e uso limitados. A infecção pelo PV é seguida de resposta imune humoral, direcionada para a principal proteína do capsídeo viral (L1). Esses anticorpos podem ser detectados durante anos, impossibilitando a sorologia de distinguir as infecções passadas das recentes (DILLNER, 1999).

A histopatologia possibilita a identificação de neoplasia intraepitelial, que pode ser um risco para a progressão do câncer. A interpretação histológica pode ser limitada,

uma vez que não é possível associar o efeito citopático ao tipo de papilomavírus envolvido na infecção, além de não permitir a identificação de infecção latente (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 2000).

Conseqüentemente, o diagnóstico da infecção pelo PV é realizado, principalmente pela detecção do ácido nucléico viral. O DNA do PV pode ser detectado por diferentes métodos de hibridação. A hibridação *in situ* utiliza sondas que anelam especificamente no genoma intracelular do PV. Entretanto, a sensibilidade desse método é limitada, pois somente detecta infecções virais com mais de 10 a 20 cópias do genoma do vírus por célula infectada. Além disso, a identificação dos tipos virais requer o uso de sondas tipo-específicas, em múltiplos experimentos de hibridação (MOLIJIN et al., 2005).

Alternativamente, o DNA viral pode ser diretamente isolado de amostras clínicas e detectado pela técnica de *Southern blot*, considerada o "padrão-ouro", ou hibridação *dot spot*. No entanto, apesar de serem técnicas importantes para a realização de pesquisas, são laboriosas e de difícil inclusão na rotina diagnóstica (KUYPERS et al., 1993).

Os métodos de diagnóstico que possibilitam a amplificação do ácido nucléico têm contribuído para o incremento da sensibilidade, assim como, da especificidade na detecção do DNA do PV. No Brasil, estudos utilizando técnicas moleculares como a hibridação *in situ*, *Southern blot*, reação em cadeia da polimerase (PCR) e seqüenciamento, permitiram a identificação de seqüências do DNA do BPV em vários tecidos e líquidos corporais de animais com papilomatose cutânea e hematúria enzoótica bovina (SANTOS et al., 1998; FREITAS et al., 2003; WOSIACKI et al., 2005, 2006; CLAUS et al., 2007).

Devido à extensa gama de tipos virais do HPV a PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos pode limitar o diagnóstico se não forem realizadas múltiplas reações tipo-específicas. Alternativamente, a utilização da PCR com *primers* consensuais tem permitido a detecção de um amplo espectro de HPV envolvidos em lesões cutâneas e mucosas. Esses *primers* flanqueiam uma região conservada em diferentes tipos de HPV. Como o gene L1 é o mais conservado do genoma do PV, vários pares de *primers* o têm como alvo para a amplificação de segmentos genômicos (MANOS et al., 1989; FORSLUND et al., 1999) (quadro 3).

Alguns fatores podem influenciar a PCR. Em geral, a eficiência da técnica decresce à medida que aumenta o tamanho do fragmento amplificado. Amostras submetidas a determinados tratamentos, como a fixação com formalina e a inclusão em parafina, também podem prejudicar o desempenho da reação (MOLIJIN et al., 2005).

Imunoprofilaxia

Na década de 1990 foram realizados os primeiros estudos sobre vacinas para diferentes tipos de BPV, que sugeriram a imunidade tipo-específica do PV (JARRET et al., 1990; 1991; CAMPO, 1995). No entanto, até o momento, nenhuma vacina comercial está disponível para a profilaxia da infecção nessa espécie animal.

A tecnologia do DNA recombinante permite a expressão da proteína L1 e a elaboração de vacinas com partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles / VLPs*). Em medicina humana, desde 2006, está disponível uma vacina quadrivalente que utiliza essa estratégia. A Gardasil®, do Laboratório Merck, Sharp & Dohme, abrange os tipos de HPV responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical (HPV-16 e HPV-18) e 90% das verrugas genitais (HPV-6 e HPV-11).

A vacina Cervarix®, do Laboratório Glaxo SmithKline, é outra possibilidade de imunização de seres humanos contra os tipos mais prevalentes de HPV na indução de neoplasias cervicais. Essa vacina já está sendo comercializada em alguns países como Austrália e Portugal. O diferencial está na utilização do adjuvante AS04 que induz resposta imune mais intensa e duradoura que outras formulações.

Perspectivas e considerações finais

A relação entre o HPV e o desenvolvimento de câncer do colo de útero foi estabelecida há apenas 30 anos. Isso pode ser considerado um evento raro na ciência, pois apenas neste período de tempo foi possível a identificação do patógeno, a definição de sua relação com a doença e o desenvolvimento de condutas terapêuticas e imunoprofiláticas.

Os avanços observados na medicina humana devem ser seguidos pela medicina veterinária, uma vez que os prejuízos ocasionados pelas diferentes enfermidades relacionadas ao BPV são limitantes em algumas explorações, como no caso de rebanhos com alta prevalência de HE.

As técnicas moleculares desenvolvidas nas últimas décadas têm possibilitado o incremento da identificação de novos tipos de PV em seres humanos e em animais. O uso de *primers* genéricos, associado às técnicas de clonagem e seqüenciamento,

tem possibilitado a identificação da variabilidade genética dos PV de origem bovina. A técnica de amplificação por círculo rolante (*rolling-circle amplification*) e a utilização de *overlapping subgenomic fragments* têm se mostrado eficiente para a amplificação do genoma completo de vários tipos de PV de origem humana e animal (BENS et al., 1998; RECTOR et al., 2005; 2006; CHEN et al., 2007).

Diferentemente do HPV, onde novos tipos virais têm sido identificados com muita frequência, a última descrição de um novo tipo de BPV (BPV-6) foi realizada em 1984 (JARRET et al., 1984). Desde então, somente evidências de supostos novos tipos virais haviam sido relatadas na espécie bovina (ANTONSSON; HANSSON, 2002; OGAWA et al., 2004; MAEDA et al., 2007). Somente em 2007 foram divulgadas as seqüências completas do genoma do BPV-8, e de uma variante do tipo 8, identificada em bisão Europeu (*Bison bonasus*) (TOMITA et al., 2007). Ogawa e colaboradores (2007), além de descreverem o BPV-7, sugerem a classificação desse novo tipo viral em um novo gênero da família *Papillomaviridae*. Recentemente, foi disponibilizado o genoma completo do BPV-9 e do BPV-10, também identificados em lesões cutâneas presentes em tetos de bovinos mantidos no Japão (HATAMA et al., 2008).

A presença de supostos novos tipos virais do BPV também foi relatada pelo nosso grupo, além de focar a diversidade viral nos rebanhos bovinos brasileiros. Em um curto espaço de tempo após a sua primeira descrição, também pudemos detectar a presença do BPV-8 no Brasil. Essa constatação reforça ser imprescindível o amplo conhecimento da epidemiologia e das características moleculares dos diferentes tipos de PV causadores de enfermidades nos animais. Somente com a definição da epidemiologia da infecção, dos tipos virais mais prevalentes, e da correlação do tipo viral com o tipo de lesão é que poderão ser realizados estudos mais complexos para o desenvolvimento e avaliação de imunógenos também em medicina veterinária.

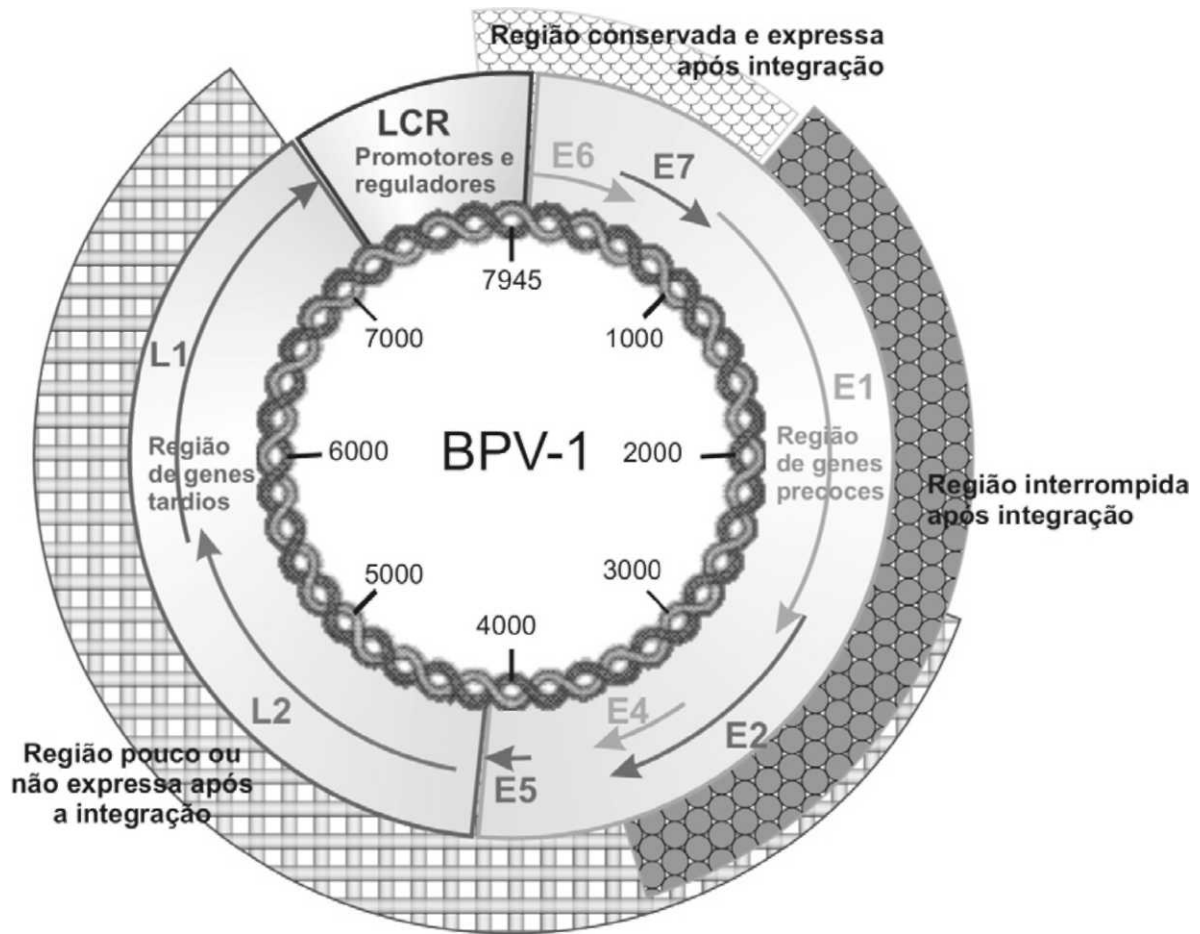


Figura 1 – Desenho esquemático do genoma do papilomavírus bovino tipo 1.

Fonte: Alfieri et al. (2008).



Figura 2 – Desenho esquemático linear do genoma do papilomavírus bovino tipo 2, disponível no GenBank (NC_001521).

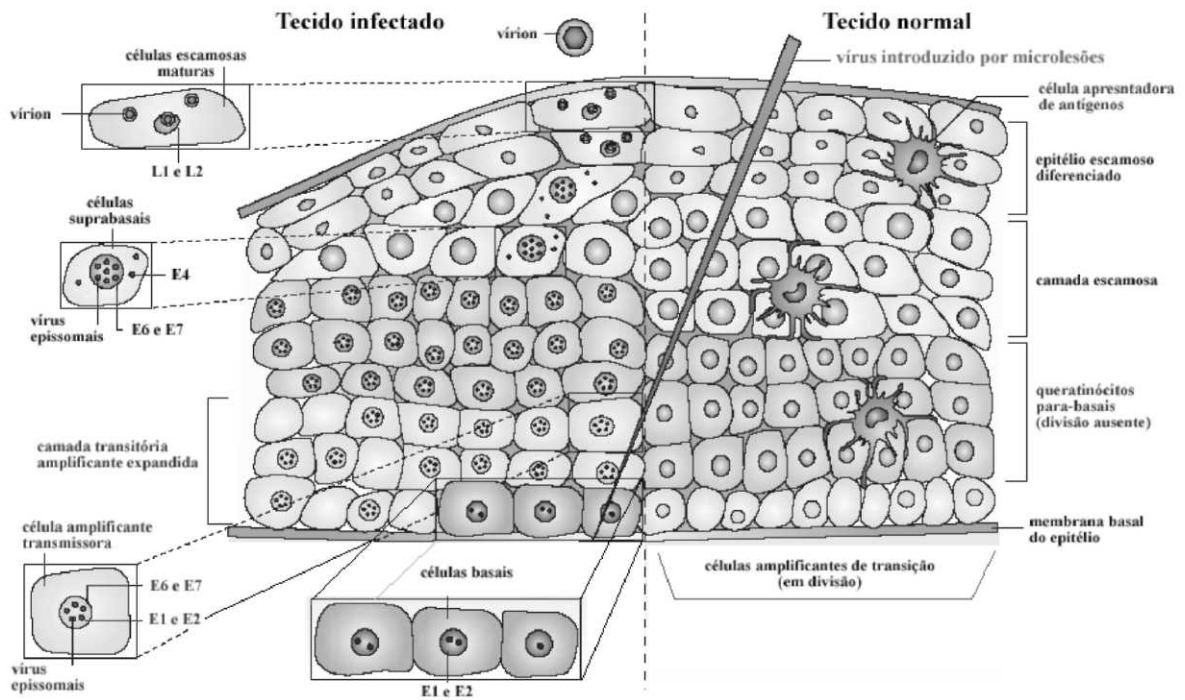


Figura 3 – Desenho esquemático da infecção pelo papilomavírus em epitélio cutâneo. Modificado de Frazer (2004).

Fonte: Alfieri et al. (2008).

Proteína	Tamanho	Função
E1	605 aa	Em conjunto com a E2, é a primeira proteína a ser codificada. É uma ATP helicase dependente, que permite o desenrolar do genoma viral, e age como fator de alongação na replicação do DNA. Atua também como proteína regulatória de oncogenes virais.
E2	306 aa	Está envolvida tanto no controle da transcrição quanto na replicação do DNA. Age como proteína regulatória de oncogenes virais.
E4	120 aa	São pequenas proteínas, expressas tardiamente, produzidas pela quebra alternativa e modificada pós-tradução. Está envolvida na transformação da célula hospedeira, desregulando a mitogênese.
E5	44 aa	Proteína de transformação celular que interage com receptores de fatores de crescimento, obstruindo os mecanismos de supressão do crescimento. Domina o controle do ciclo celular.
E6	137 aa	Proteína de transformação celular que ao se ligar à p53 (proteína de supressão de tumores) ocasiona a sua degradação. Também domina o ciclo celular.
E7	127 aa	Proteína de transformação celular que ao se ligar à pRb ou p107 (proteínas de supressão de tumores) ocasiona a sua degradação. Também domina o ciclo celular.
L1	495 aa	Proteína principal do capsídeo. Representa 80% do capsídeo protéico e contém epítopos que induzem anticorpos neutralizantes.
L2	469 aa	Proteína secundária do capsídeo viral. Também contém epítopos que induzem anticorpos neutralizantes.

Quadro 1 – Funções das proteínas codificadas pelo papilomavírus bovino tipo 1 (NC_001522).

Fonte: Alfieri et al. (2008).

Tratamento	Modo de utilização	Resultados obtidos de cura (%)	Referências
Papilomax pomada ^(a)	3x/semana/dias alternados	90	Embrapa – Centro de pesquisas, gado de leite
autohemoterapia	20 mL via IM	50 38,09	SANTIN & BRITO, 2004 SILVA et al., 2001
autovacina	10-15 mL via SC	50 50 73,13	SANTIN & BRITO, 2004 SILVA et al., 2004 SILVA et al., 2001
Clorobutanol ^(b)	50 mg/kg/PV via SC	60 42	SANTIN & BRITO, 2004 SILVA et al., 2001
diaminazina	3,5 mg/kg/PV	45 27	SANTIN & BRITO, 2004 SILVA et al., 2001
implante pediculado			
B09 – Fator Figueira – homeopatia	1,6 g/cabeça/dia		Arenales Fauna e Flora®
ozonioterapia			PEREIRA et al., 2005
levamisole	7,5 mg/kg/PV via SC	25	SANTIN & BRITO, 2004
ivermectina	1 ou 2 doses 0,2 mg/Kg/PV via SC	77,7 – 88,8	BÖRKÜ et al., 2007

^(a) **Papilomax®** pomada: Carbonato de cálcio ...50,66g Formaldeído ..18,94g desenvolvido e patentado pela Embrapa Gado de Leite, para o tratamento dos papilomas (figueiras ou verrugas) dos bovinos. O produto, testado e aprovado cientificamente, é comercializado sob a forma de pomada para uso tópico.

^(b) Verruclin⁸, Verrudel®, Verrutrat®, Verrugado® são a base de clorobutanol

Quadro 2 – Medidas terapêuticas preconizadas para a papilomatose cutânea bovina.

Primer ^a	Seqüência ^b	nt HPV-8
FAP59	5' TAA CWG TIG GIC AYC CWT ATT 3'	5981-6001
FAP64	5' CCW ATA TCW VHC ATI TCI CCA TC 3'	6458-6436

^a Fourslund et al. 1999.

^b Nucleotídeos degenerados: W=T, C; I=Inosina; Y=C, T; V=A, C, G; H=A, T, C.

Quadro 3 – *Primers* utilizados na reação em cadeia da polimerase para a identificação e análise filogenética do papilomavírus bovino associado a lesões cutâneas.

REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A.A.; WOSIACKI, S.R.; ALFIERI, A.F. Família *Papillomaviridae*. In: Flores, E.F. *Virologia Veterinária*. Editora da Universidade Federal de Santa Maria, capítulo 15, 23p., 2008.
- ANTONSSON, A.; FORSLUND, O.; EKBERG, H.; STERNER, G.; HANSSON, B.G. The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *Journal of Virology*, v.74, p.11636-11641, 2000.
- ANTONSSON, A.; HANSSON, B.G. Healthy skin of many species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *Journal of Virology*, v.76, p.2537-12542, 2002.
- ANTONSSON, A.; MC MILLAN, N.A. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. *Journal of Virology*, v.87, p.3195-3120, 2006.
- BAKER, C.C.; HOWLEY, P.M. Differential promoter utilization by the papillomavirus in transformed cells and productively infected wart tissues. *EMBO Journal*, v.6, p.1027-1035, 1987.
- BENS, G.; WIELAND, U.; HOFMANN, A.; HÖPFL, R.; PFISTER, H. Detection of new human papillomavirus sequences in skin lesions of a renal transplant recipient and characterization of one complete genome related to epidermodysplasia verruciformis-associated types. *Journal of General Virology*, v.79, p.779-787, 1998.
- BERNARD, H.U.; CHAN, S.Y.; DELIUS, H. Evolution of papillomaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.186, p.33-54, 1994.
- BERNARD, H.U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*, s.32, s.1-6, 2005.
- BLOCH, N.; BREEN, M.; IRVIN, Z.V.; SPRADBROW, P.B. Bovine papillomavirus type 4 DNA isolated from a skin lesion in a steer. *The Veterinary Record*, v.136, p.414-416, 1996.
- BORKU, M.K.; ATALAY, O.; KIBAR, M.; CAM, Y.; ATASEVER, A. Ivermectina is an effective treatment for bovine cutaneous papillomatosis. *Research in Veterinary Science*, v.83, p.360-363, 2007.

BORZACCHIELLO, G.; IOVANE, G.; MARCANTE, M.L.; POGGIALI, F.; ROPERTO, F.; ROPERTO, S.; VENUTI, A. Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumors in cows. *Journal of General Virology*, v.84, n.11, p.2921-2926, 2003.

BOSCH, F.X.; LORINEZ, A.; MUNOZ, N.; MEIJER, C.J.; SHAN, K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Clinical Pathology*, v.55, p.244-265, 2002.

BRAVO, I.G.; ALONSO, A. Mucosal human papillomaviruses encode four different E5 proteins whose chemistry and phylogeny correlate with malignant or benign growth. *Journal of Virology*, v.78, p.13613-13626, 2004.

BURK, R.; DeSALLE, R. The tango and tangle of human papillomavirus and the human genome. *Journal of the National Cancer Institute*, v.88, n.15, p.1026-1027, 2006.

CAMPO, M.S.; JARRET, W.F.H.; BARRON, R.; ONEIL, B.W.; 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.

CAMPO, M.S.; JARRET, W.F. Vaccination against cutaneous and mucosal papillomavirus in cattle. *Ciba Found Symposium*, n.187, p.61-73, 1994.

CAMPO, M.S.; ONEIL, B.W.; BARRON, R.; JARRET, W.F. Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. *Carcinogenesis*, v.15, n.8, p.1597-1601, 1994.

CAMPO, M.S. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. *Trends in Microbiology*, v.3, p.92-97, 1995.

CAMPO, M.S. Review 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.

CHAMBERS, G.; ELLSMORE, V.A.; O'BRIEN, P.M.; REID, S.W.J.; LOVE, S.; CAMPO, M.S.; NASIR, L. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *Journal of General Virology*, v.84, p.1055-1062, 2003.

CHAN, S-Y.; BERNARD, H-U.; ONG, C-K.; CHAN, S-P.; HOFMANN, B.; DELIUS, H. Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses. *Journal of Virology*, v.66, n.10, p. 5714-5725, 1992.

CHAN, S-Y.; HO, L.; ONG, C-K, CHOW, V.; DRESCHER, B.; DUERST, M.; TER MEULEN, J.; VILLA, L.; LUANDE J.; MGAYA, H.N.; BERNARD, H.U. Molecular variants of human papillomavirus-16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *Journal of Virology*, v.66, n.10, p.2057-2066, 1992b.

CHAN, S-Y.; DELIUS, H.; HALPERN, A.L.; BERNARD, H-U. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *Journal of Virology*, v.69, n.5, p.3074-3083, 1995.

CHAN, S-Y.; BERNARD, H-U.; RATTERREE, M.; BIRKEBAK, T.A.; FARAS, A.J.; OSTROW, R. Genomic Diversity and Evolution of Papillomaviruses in Rhesus Monkeys. *Journal of Virology*, v.71, n.7, p.4938-4943, 1997.

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.

CHEN, Z.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; DESALLE, R.; BURK, R. Human papillomavirus (HPV) isolated from cervicovaginal cells lack an E6 open reading frame (ORF) and related to gamma-papillomaviruses. *Virology*, v.360, n.2, p.447-453, 2007.

CLAUS, M.P.; VIVIAN, D.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Phylogenetic analysis of bovine papillomavirus associated with skin warts in cattle herds from the state of Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, p.314-318, 2007.

CULLEN, A.P.; REID, R.; CAMPION, M.; LÒRINCZ, 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 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among Papovaviridae. *EMBO Journal*, v.1, p.231-236, 1982.

de VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. *Virology*, v.20, n.324, p.17-27, 2004.

DILLNER, J. The serological response to papillomaviruses. *Seminars in Cancer Biology*, v.9, p.423-430, 1999.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, s.32, s.7-15, 2005.

FOLEY, A.M.; SCHROEDER, B.A.; REDLOW, A.E.; FICK-CHILD, K.J.; TEAS, W.G. Fibropapillomatosis in stranded green turtles (*Chelonia mydas*) from the eastern United States (1980-98): trends and associations with environmental factors. *Journal of Wildlife Diseases*, v.41, n.1, p.29-41, 2005.

FORSLUND, O.; ANTONSSON, A.; NORDIN, P.; 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, p.2437-2443, 1999.

FRAZER, I.H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature*, v.4, p.46-54, 2004.

FREITAS, A.C.; CARVALHO, C.; BRUNNER, O.; BIRGEL-JR, E.H.; DELLALIBERA, A.M.M.P.; BENESI, F.J.; GREGORY, L.; BECAK, W.; SANTOS, R.C.S. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, suppl.1, p.76-78, 2003.

GAVA, A.; SILVA NEVES, D.; GAVA, D.; MOURA, S.T.; RIET-CORREA, F. Bracken fern (*Pteridium aquilinum*) poisoning in cattle in southern Brazil. *Veterinary and Human Toxicology*, v.44, n.6, p.362-5, 2002.

GIRI, L.; DANOS, O. Papillomavirus genomes: from sequence data to biological properties. *Trends in Genetics*, v.2, p.227-232, 1986.

GOTTSCHLING, M.; STAMAKIS, A.; NINDL, I.; STOCKFLETH, E.; ALONSO, A.; BRAVO, I. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. *Molecular Biology and Evolution*, v.24, n.5, p.1242-1258, 2007.

GUPTA, M.P.; GUPTA, P.P.; RATHORE, S.S.; GUPTA, A.K. Bovine cutaneous papillomatosis - a case report. *Indian Veterinary Journal*, v.66, p.358-359, 1989.

- HALPERN, A.L. Comparison of papillomavirus and immunodeficiency virus evolutionary patterns in the context of a papillomavirus vaccine. *Journal of Clinical Virology*, v.19, p.43-56, 2000.
- HASS, S.; PARK, T.W.; VOIGT, E.; BUTTNER, R.; MERKELBACH-BRUSE, S. Detection of HPV 52, 58, and 87 in cervicovaginal intraepithelial lesion of HIV infected women. *International Journal of Molecular Medicine*, v.16, p.815-819, 2005.
- 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.
- HO, L.; CHAN, S-Y.; BURCK, R.D.; DAS, B.C.; FUJINAGA, K.; ICENOGLE, J.P.; KAHN, T.; KIVIAT, N.; LANCASTER, W.; MAVROMARA-NAZOS, P.; LABROPOULOU, V.; MITRANI-ROSENBAUM, S.; NORRILD, B., PILLAI, M.R.; STOERKER, J.; SYRJAENEN, K.; SYRJAENEN, S.; TAY, S-K.; VILLA, L.L.; WHEELER, C.M.; WILLIAMSON, A-L.; BERNARD, H-U. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *Journal of Virology*, v.67, n.11, p.6413-6423, 1993.
- HOPKINS, N.C.G. Aetiology of enzootica haematuria. *The Veterinary Record*, v.118, n.26, p.715-717, 1986.
- HOWLEY, P.M.; LOWY, D.R. Papillomaviruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields' Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, cap. 65, p.2197-2229, 2001.
- JACKSON, M.E.; PENNIE, W.D.; McCAFFERY, R.E.; SMITH, K.T.; GRINDLAY, G.J.; CAMPO, M.S. The B subgroup bovine papillomavirus lack an identifiable E6 open reading frame. *Molecular Carcinogenic*, v.4, n.5, p.382-387, 1991.
- JARRETT, W.F.H.; CAMPO, M.S.; O'NEIL, 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.
- JARRET, W.F.H.; O'NEIL, B.W.; GAUKROGER, J.M.; SMITH, K.T.; LAIRD, H.M.; CAMPO, M.S. Studies on vaccination against papillomavirus: The immunity after infection and vaccination with bovine papillomavirus of different types. *The Veterinary Record*, v.126, p.473-475, 1990.

JARRETT, W.F.; SMITH, K.T.; O'NEIL, B.W.; GAUKROGER, J.M.; CHANDRACHUD, L.M.; GRINDLAY, G.J.; McGARVIE, G.M.; CAMPO, M.S. Studies on vaccination against papillomaviruses: prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. *Virology*, v.184, n.1, p.33-42, 1991.

JELINEK, F.; TACHEZY, R. Cutaneous papillomatosis in cattle. *Journal of Compedium Pathology*, v.132, p.70-81, 2005.

KNOWLES, G.; O'NEIL, B.W.; CAMPO, M.S. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. *Journal of Virology*, v.70, n.12, p. 8451-8458, 1996.

KUYPERS, J.M.; CRITCHLOW, C.W.; GRAVITT, P.E.; VERNON, D.A.; SAYER, J.B.; MANOS, M.M.; KIVIAT, N.A. Comparison of dot filter hybridization, Southern transfer hybridization, and polymerase chain reaction amplification for diagnosis of anal human papillomavirus infection. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.4, p.1003-1006, 1993.

LEVI, J.E.; KLETER, B.; QUINT, W.G.V.; FINK, M.C.S.; CANTO, C.L.M.; MATSUBARA, R.; LINHARES, I.; SEGURADO, A.; VANDERBORGHT, B.; ELUF NETO, J.; VAN DOORN, L-J. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiples HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.9, p.3341-3345, 2002.

MAEDA, Y.; SHIBAHARA, T.; WADA, Y.; KADOTA, K.; KANNO, T.; UCHIDA, I.; HATAMA, S. An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. *Veterinary Microbiology*, v.121, n.3-4, p.242-248, 2007.

MANOS, M.M.; TING, Y.; WRIGHT, D.K.; LEWIS, A.J.; BROKER, T.R.; WOLINKY, S.M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cell*, v.7, p.209-214, 1989.

MOLIJN, A.; KLETER, B.; QUINT, W.; VAN DOORN, L-J. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *Journal of Clinical Virology*, s.32, s.43-51, 2005.

NICHOLLS, P.K.; STANLEY, M.A. The immunology of animal papillomaviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.73, p.101-127, 2000.

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, n.8, 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, n.7, p.1934-1938, 2007.

OLSON, C.; OLSON, R.O.; HUBBARD-VAN STELLE, S. Variations of response of cattle to experimentally induced viral papillomatosis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.201, n.1, p.56-61, 1992.

ONG, C-K.; CHAN, S-Y.; CAMPO, M.S.; FUJINAGA, K.; MAVROMARA-NAKOS, P.; LABROPOULOU, V.; PFISTER, H.; TAY, S-K.; TER MEULEN, J.; VILLA, L.L.; BERNARD, H-U. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with ethnic groups. *Journal of Virology*, v.67, n.11, p.6424-6431, 1993.

PEREIRA, R.F.S.; CARNEIRO, W.P.; MANZAN, R.M.; PEREIRA, D.F.S.; SILVA, M. Tratamento da papilomatose bovina com ozonioterapia. Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao2005_27b/tratamento.pdf>. Acesso em: 10/01/2008.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.N. Doenças causadas por vírus e chlamydia II. In: *Clínica Veterinária*, 9ª edição, Editora Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro, cap.21, p.1116-1118, 2000.

RECTOR, A.; VAN DOORSLAER, K.; BERTELSEN, M.; BARKER, I.K.; OLBERG, R-A.; LEMEY, P.; SUNDBERG, J.P.; VAN RANST, M. Isolation and cloning of raccoon (*Procyon lotor*) papillomavirus type 1 by using degenerate papillomavirus-specific primers. *Journal of General Virology*, v.86, p.2029-2033, 2005.

RECTOR, A.; MOSTMANS, S.; VAN DOORSLAER, K.; McKNIGHT, C.A.; MAES, R.K.; WISE, A.; KIUPEL, M.; VAN RANST, M. Genetic characterization of the first chiropteran papillomavirus, isolated from a basosquamous carcinoma in an Egyptian fruit bat: The *Rousettus aegyptiacus* papillomavirus type 1. *Veterinary Microbiology*, v.117, p.267-275, 2006.

SANTIN, A.P.I.; BRITO, L.A.B. Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos. *Ciência Animal Brasileira*, v.5, n.1, p.39-45, 2004.

SANTOS, R.C.S.; LINDSEY, C.J.; FERRAZ, O.P.; PINTO, J.R.; MIRANDOLA, R.S.; BENESI, F.J.; BIRGEL, E.H.; PEREIRA, C.A.B.; BEÇAK, W. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *Journal of General Virology*, v.79, p.2127-2135, 1998.

- SCHUCH, L.F.D. Papilomatose Bovina. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.D.C. *Doenças de Ruminantes e Eqüinos*. Pelotas: Ed. Universitária/UFPel, p.115-118, 1998.
- SEEDORF, K.; KRÄMMER, G.; DÜRST, M.; SUHAI, S.; RÖWEKAMP, W.H. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*, v.145, p.181-185, 1985.
- SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; DeSALLE, R.; HILDESHEIM, A.; WACHOLDER, S.; RODRIGUEZ, A.C.; BRATTI, M.C.; SHERMAN, M.E.; MORALES, J.; GUILLEN, D.; ALFARO, M.; HUTCHINSON, M.; WRIGHT, T.C.; SOLOMON, D.; CHEN, Z.; SCHUSSLER, J.; CASTLE, P.E.; BURK, R.D. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology*, v.337, p.76-84, 2005.
- SHIMMIN, I.C.; CHANG, B.H.; LI, W.H. Male-driven evolution of DNA sequences. *Nature*, v.362, p.745-747, 1993.
- SILVA, L.A.F.; SANTIN, A.P.I.; FIORANTI, M.S.C.; DIAS FILHO, F.C.; EURIDES, D. Papilomatose bovina: comparação e avaliação de diferentes tratamentos. *Hora Veterinária*, n.121, p.55-60, 2001.
- SILVA, L.A.F.; VERÍSSIMO, A.C.C.; VIANA FILHO, P.R.L.; FIORANTI, M.S.C.; EURIDES, D.; LINHARES, G.C.F.; ROMANI, A.F.; TRINDADE, B.R. Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamentos para papilomatose bovina. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, Uruguaiana*, v.11, n.1, p.153-165, 2004.
- SMITH, H.A.; JONES, T. C.; HUNT, R.D. *Veterinary Pathology*, 4^o ed, Lea&Febiger, Philadelphia, p.508-515, 1995.
- SYRJÄNEN, K.; SYRJÄNEN, S. Papillomavirus: Infections in human pathology. England: Wiley, 615 p., 2000.
- 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, n.19, p. 10020-10023, 2002.
- TOMITA, Y.; LITERÁK, 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.

VARSANI, A.; VAN DER WALT, E.; HEATH, L., RYBICKI, E.P.; WILLIAMSON, A.L.; MARTIN, D.P. Evidence of ancient papillomavirus recombination. *Journal of Virology*, n.87, p.2527-2531, 2006.

WOSIACKI, S.R.; BARREIROS, M.A.B.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Semi-Nested-PCR for detection and typing of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *Journal of Virological Methods*, v.126, n.1-2, p.215-219, 2005.

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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, p.635-638, 2006.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar os tipos de papilomavírus associados a papilomas cutâneos em bovinos da região norte do estado do Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar a técnica da PCR com *primers* genéricos para a amplificação parcial do gene L1 do papilomavírus bovino;
- Sequenciar e realizar a análise de identidade dos produtos amplificados pela PCR para a determinação do tipo de papilomavírus bovino;
- Clonar e sequenciar os produtos da PCR nos quais as seqüências de nucleotídeos não permitirem a determinação do tipo viral;
- Identificar as formas mais freqüentes de infecção (simples, mista ou co-infecção) pelo BPV.

3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1 IDENTIFICATION OF UNREPORTED PUTATIVE NEW BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPES IN BRAZILIAN CATTLE HERDS

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico *Veterinary Microbiology*

Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds

Abstract

The amplification by degenerate primers FAP59/FAP64 and sequencing allowed the detection of 15 putative new BPV types in cutaneous warts as well as in healthy skin. Four of these isolates were recently recognized as new BPV types (BPV-7, -8, -9, -10) after determination of their complete genome sequences. In Brazil, investigations involving the definition of BPV types present in skin warts are still rare. The aim of the current study is to report the identification of putative new BPV types in cutaneous papillomatosis observed in Brazilian cattle herds. Twenty-two cutaneous papilloma specimens were taken individually from diverse body sites of bovines, originated from dairy ($n=2$) and beef ($n=2$) cattle herds from northern region of Paraná state, southern Brazil. The PCR assay was carried out using primer pair FAP59/FAP64. All PCR products with approximately 480 bp were submitted to direct sequencing. Cloning was performed for the amplicons which prior analysis revealed as a putative new BPV type. From 16 cutaneous lesions, BPV-1, -2, and -6 were identified in two, six, and eight papilloma specimens, respectively. In addition, four putative new BPV types were identified in other six skin warts, and then designated as BPV/BR-UEL2 to -5. The detection of the BPV-1, -2, and -6 types in skin wart specimens supports the existence of these BPV types throughout the Brazilian cattle herd. In addition, the identification of four putative new BPV types is the first report of the presence of different BPV types in American continent.

Keywords: cattle; cutaneous papillomatosis; bovine papillomavirus; phylogenetic analysis

3.1.1. Introduction

Papillomaviruses (PVs) are a diverse group of small, non-enveloped, and double-stranded circular DNA viruses that occur in a broad range of distantly related animal species such as birds, human beings, and bovines (Antonsson and Hansson, 2002; de Villiers et al., 2004).

While more than a hundred human papillomavirus (HPV) types have been detected from both benign and malignant lesions in humans, only six BPV types had been characterized before 1984 (Pfister et al., 1979; Campo et al., 1980, 1981; Campo and Coggins, 1982; Chen et al., 1982; Jarrett et al., 1984). However, the use of PCR assays with degenerate primers that amplify relatively conserved regions in the L1 gene, followed by sequencing, has allowed the identification of several PV types in human and other animal hosts.

The amplification by degenerate primers FAP59/FAP64 and sequencing enable the detection of 15 putative new BPV types in teat skin warts as well as in healthy teat skin of cattle from Japan and Sweden (Forslund et al., 1999; Antonsson and Hansson, 2002; Ogawa et al., 2004). After characterization of their complete genome sequences, four of these Japanese isolates were recently recognized as new BPV types (BPV-7, -8, -9, and -10) (Ogawa et al., 2007; Tomita et al., 2007; Hatama et al., 2008).

At present, the *Papillomaviridae* family is formed by 18 genera (*Alphapapillomavirus* to *Sigmampapillomavirus*), being such classification based on nucleotide sequence diversity verified in the L1 open reading frame (ORF) (de Villiers et al., 2004). The BPV types are classified in four different genera, *Deltapapillomavirus* (BPV-1 and -2), *Xipapillomavirus* (BPV-3, -4, -6, -9, and -10), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 and -8), and a yet unassigned PV genus (BPV-7) (de Villiers et al., 2004; Ogawa et al., 2007; Tomita et al., 2007; Hatama et al., 2008).

In Brazil, the association between the BPV infections and the occurrence of cutaneous papillomatosis, chronic enzootic haematuria, and cancer of upper gastrointestinal tract, has been suggested in cattle. In addition, previous investigations involving the definition of BPV types related to each of these different clinical outcomes revealed that BPV-1 is present in skin warts, peripheral blood and plasma, while the BPV-6 was identified in papilloma specimens (Santos et al., 1998; Freitas et al., 2003; Claus et al., 2007). Moreover, BPV-2 was detected in whole blood and urinary bladder from cattle with enzootic haematuria and cutaneous papillomatosis (Wosiacki et al., 2005, 2006; Claus et al., 2007).

The aim of the current study was to report the identification of four unreported putative new BPV types associated with cutaneous papillomatosis observed in Brazilian cattle herds.

3.1.2. Materials and Methods

3.1.2.1 Papilloma specimens

Twenty-two cutaneous papilloma specimens were individually collected from diverse body sites of adult bovines. The animals were originated from dairy ($n=2$) and beef ($n=2$) cattle herds from northern region of Paraná state, southern Brazil. Fragments from each papilloma specimen were ground in phosphate-buffered saline solution (PBS pH 7.2), and suspensions (10-20% w/v) were centrifuged for 15 min at 3000 g at 4 °C. Aliquots (250 µl) from supernatant were treated with lysis buffer [10mM Tris; 1mM EDTA; 0.5% Nonidet P40; 1% SDS; and 0.2 mg/ml proteinase K (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA)]. After homogenization, samples were incubated at 56 °C for 30 min.

3.1.2.2 DNA extraction

For DNA extraction, a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidine isothiocyanate methods was carried out according to Alfieri et al. (2006). Briefly, fractions from each sample were treated with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), homogenized and heated at 56 °C for 15 min (Sambrook and Russell, 2001). After centrifugation at 10,000 g for 10 min, the aqueous phase was processed according to silica/guanidine isothiocyanate method (Boom et al., 1990). DNA was eluted in 50 µl of ultrapure (MilliQ[®]) sterile water and kept at -20 °C until usage. Aliquots of ultrapure sterile water were included as negative control in the DNA extraction procedures.

3.1.2.3 PCR assay

The PCR assay was carried out using the primer pair FAP59 (forward: 5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3') and FAP64 (reverse: 5'-CCWATATCWWHCATITCICCATC-3') according to Forslund et al. (1999), with slight modifications (Claus et al., 2007). Reaction was performed using 5 µl of the extracted DNA and 45 µl of PCR-mix consisting of 1 µl (20 pmol) from each primer; 200 µM of each dNTP (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA); 2.5 units of *Platinum Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Life Technologies, BR); 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4 and 50 mM KCl); 1.5 mM of MgCl₂ and ultrapure sterile water to a final volume of 50 µl. Amplification was performed in a thermocycler (PTC 200, MJ Research Co., USA) with the following cycling profile: an initial step of 10 min at 94 °C, followed by 40 cycles of 1 min/94 °C, 1 min/50 °C, 1 min/72 °C, and a final extension step of 10 min/72 °C. Aliquots of 5 µl from the PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel in TBE buffer pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA) at constant voltage (90V) for approximately 45 min. These were stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml), and visualized under UV light.

3.1.2.4 Sequence analysis

Initially, all PCR products were purified using PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA). After that, a direct sequencing was performed by using the DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences, UK) with FAP59 and FAP64 primers, in a MegaBACE 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequencer (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), according to the manufacturer's instructions.

The obtained sequences were examined with the PHRED software for quality analysis of chromatogram readings. The sequences were accepted if base quality was equal to or higher than 20. Consensus sequences were determined by CAP3 software and the sequence identity was verified with all sequences deposited in the GenBank using the BLAST software.

The guidelines from the Papillomavirus Nomenclature Committee 1995 (14th International Papillomavirus Conference, Quebec City, Quebec, Canada) were followed to identify putative new PV types. A new PV isolate is defined as such if its complete genome has been cloned and the L1 nucleotide sequence is more than 10% dissimilar from the closest known PV type. Differences between 2% and 10% identity define a subtype and less than 2% a variant. Since FAP59/FAP64 products represent only part of the L1 gene, the sequences obtained were denominated putative new PV types instead of new PV types (Antonsson and Hansson, 2002; de Villiers et al., 2004; Ogawa et al., 2004).

3.1.2.5 Cloning

For the amplicons revealed as putative new BPV types by the prior analysis, cloning using the TOPO TA Cloning kit for Sequencing (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA) was carried out according to the manufacturer's instructions. A further sequencing in

both directions, using the M13 forward and reverse primers, employing the plasmid DNA from two selected clones each PV-positive sample, was performed.

3.1.2.6 Phylogenetic analysis

The alignment and degree of similarity among sequences, at both nucleotide and amino acid levels, were obtained using BIOEDIT version 5.0.9 software (Hall, 1999). Phylogenetic trees were obtained by the Neighbour-joining method with the Kimura two-parameter distance estimate (Kimura, 1980), using MEGA version 3.1 program (Kumar et al., 2004). Statistical analysis of phylogenetic trees were determined by bootstrap method on 1000 replicates.

The following PVs were included in the phylogenetic analysis: some cutaneous and mucous HPVs, and some animals PVs. The putative new BPV types denominated BAA1 to -4 and BAPV3, -4, -5, -7, -8, -9, and -10, described by Antonsson and Hansson (2002) and Ogawa et al. (2004), respectively, were also included in analysis. The GenBank accession numbers of BPV and putative new BPV types sequences reported in this paper are: AF4885375 (BAA1); AF4885376 (BAA2); AF4885377 (BAA3); AF4885378 (BAA4); AY300819 (BAPV3); AY426550 (BAPV4); AY426551 (BAPV5); AY426553 (BAPV7); AY426554 (BAPV8); AY426555 (BAPV9); AY426556 (BAPV10); XO2346 (BPV-1); M20219 (BPV-2); AF486184 (BPV-3); XO5817 (BPV-4); AJ620206 (BPV-5); AJ620208 (BPV-6); DQ217793 (BPV-7); DQ098913 (BPV-8); AB331650 (BPV-9); AB331651 (BPV-10).

3.1.3. Results

In this study, PV DNA was detected in all DNA samples extracted from the 22 papilloma specimens by using the PCR assay with the FAP59/FAP64 primer pair, resulting in amplicons with approximately 480 bp size.

Sequence analysis of these FAP products revealed the presence of both previously described BPV types and also unrelated putative new BPV types. From 16 cutaneous lesions, BPV-1, -2, and -6 were identified in two, six, and eight papilloma specimens, respectively. Additionally, four putative new BPV types were identified in six other skin warts. Four Brazilian putative new BPV types were confirmed by cloning and a further sequencing, and then designated as BPV/BR-UEL2 to -5 (GenBank accession numbers: EU293538, EU293539, EU293540, and EU293541, respectively). In table 1, some lesion characteristics are indicated as well as the highest similarity percentage of Brazilian putative new BPV types with BPV types 1 to 10. BPV/BR-UEL2 and -3 isolates were clustered with both *Xipapillomavirus* representatives (BPV-3, -4, -6, -9, and -10) and some putative new BPV types (BAA1; BAPV3, -8, -9, and -10). BPV/BR-UEL4 was grouped together with *Deltapapillomavirus* representatives (BPV-1 and -2), while BVP/BR-UEL5 was found with *Epsilonpapillomavirus* representatives (BPV-5 and -8) and a putative BPV type (BAPV4) (Figure 1b). In addition, identity analysis based on amino acid alignments of our isolates with their closest related BPV types revealed the following identities: i) BPV/BR-UEL2, 82% with BPV-4; ii) BPV/BR-UEL3, 86% with BPV-4; iii) BPV/BR-UEL4, 97% with BPV-2; iv) BPV/BR-UEL5, 87% with BPV-8.

3.1.4. Discussion

Cutaneous papillomatosis represents an important health problem throughout Brazilian cattle herds, mainly in dairy farms. Despite the relatively common occurrence of BPV

infection in Brazil, few studies have been conducted in order to identify the viral types involved in skin and mucosal lesions. Since late-1990s, only BPV-1 and BPV-2 had been described using specific primers in different clinical specimens (Santos et al., 1998; Freitas et al., 2003; Wosiacki et al., 2005; 2006). However, in a recent investigation, the use of primer pair FAP59/FAP64 also enabled the identification of BPV-1, -2, -6, and -8 in skin warts of cattle from Paraná state of Brazil, being this the first time that BPV-2 was detected by FAP primer set (Claus et al., 2007; 2008, submitted).

In the present study, we have also detected BPV-1, -2, and -6 in papilloma specimens from dairy and beef cattle herds in southern Brazil. Additionally, the strategy involving the use of a general primer pair allowed the detection of four putative new BPV types in American continent, which not yet have been described around the world.

All Brazilian putative new BPV types identified in the current study were grouped with other BPV types, representing three previously defined PV genera (*Deltapapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus* and *Xipapillomavirus*) (de Villiers et al., 2004). Moreover, the phylogenetic analysis based on amino acid alignments has demonstrated the same grouping pattern as that observed at nucleic acid level (data not shown).

Previous studies involving the use of FAP59/FAP64 primer pair provided the description of 15 putative BPV types. Four of these putative BPV types have already been recognized as new BPV types (BPV-7, -8, -9, and -10) (Ogawa et al., 2007; Tomita et al., 2007; Hatama et al., 2008). In spite of this study comprising the analysis of 22 skin wart specimens, the identification of four unreported putative new BPV types from four cattle herds analyzed, and also the presence of two different novel putative viral types in a same herd (n. 2) suggests a great diversity of BPV types throughout Brazil. Likewise, the identification of isolate BPV/BR-UEL4 in three cutaneous samples, having two of them been obtained from animals belonging to farms distantly situated, with approximately 200

kilometers in between them, and at different times of occurrence (two-years interval), is also in agreement with this suggestion. Moreover, BPV/BR-UEL4 isolate represents the first putative BPV type closely related with *Deltapapillomavirus* representatives.

Contrary to previous related putative BPV types, which were only obtained from healthy skin swabs and teat papillomas, three of these four putative new BPV types were collected from other body sites (table 1). Besides, the BPV/BR-UEL4 isolate was found in two different body sites (ear and neck) of the same animal. All the Brazilian putative new BPV types were detected from skin warts, which may suggest their potential for causing cutaneous lesions. On the other hand, some previously described putative BPV types such as BAA1 and BAPV7 to -10, were only detected from healthy skin. Therefore, further studies are necessary in order to confirm their ability to induce cutaneous papillomatosis.

The detection of BPV-1, -2, and -6 types in skin wart specimens supports the existence of these BPV types in Brazilian cattle herds. Additionally, the identification of four putative new BPV types is the first report of the presence of yet unclassified BPV types in American continent. This is also in agreement with previous studies performed in Asia (Japan) and Europe (Sweden), which suggest the existence of a broad range of BPV types (Antonsson and Hansson, 2002; Ogawa et al., 2004; Maeda et al., 2007). Moreover, identification of the Brazilian putative new BPV type (BPV/BR-UEL3), closely related to the recently described BPV-8 supports the possibility of the existence of several and prevalent BPV types that have been undetected through the years.

General primers have been a useful tool in detecting putative new BPV types, collaborating on the determination of BPV type spectrum correlated to skin warts in dairy and beef cattle herds. By using this strategy, the detection of Brazilian putative new types corroborates with the hypothesis that innumerable BPV types have been undetected for

decades. However, this is not due to the inexistence of viral diversity but to inadequate molecular biology techniques leading to their not detection.

Furthermore, an epidemiological study to investigate the prevalence of the Brazilian putative new BPV types described in this study as well as to verify their association with cutaneous lesions in cattle would have future implication in vaccine development, similarly to what happened in HPV.

References

- Alfieri, A.A., Parazzi, M.E., Takiuchi, E., Médici, K.C., Alfieri, A.F., 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 521-526.
- Antonsson, A., Hansson, B.G., 2002. Healthy skin of many species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J. Virol.* 76, 2537-2542.
- Bernard, H.U., 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* 32, 1-6.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E., Noordaa, J. Van Der., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28, 495-503.
- Chan, S-Y., Delius, H., Halpern, A., Bernard, H.U., 1995. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing phylogeny, and taxonomy. *J. Virol.* 69, 3074-3083.

Claus, M.P., Vivian, D., Lunardi, M., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2007. Análise filogenética de papilomavírus bovino associado com lesões cutâneas em rebanhos do Estado do Paraná.[Phylogenetic analysis of bovine papillomavirus associated with skin warts in cattle herds from the state of Paraná]. *Pesq. Vet. Bras.* 27, 314-318.

Claus, M.P., Lunardi, M., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2008. The new bovine papillomavirus type 8, recently described in Asia and Europe, also found in the American continent. Submitted.

de Villiers, E-M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.U., Zur Hausen, H., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17-27.

Doorbar, J., 2005. The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virology*, 32, 7-15.

Forslund, O., Antonsson, A., Nordin, P., Hansson, B.G., 1999. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J. Gen. Virology* 80, 2437-2443.

Freitas, A.C., Carvalho, C., Brunner, O., Birgel-Jr, E.H., Dellalibera, A.M.M.P., Benesi, F.J., Gregory, L., Beçak, W., Santos, R.C.S., 2003. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Braz. J. Microbiol.* 34, 76-78.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. 41, 95-98.

- Hatama, S.; Nobumoto, K.; Kanno, T. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10, 2008. *J. Gen. Virol.*, 89(1), 158-163.
- Jarrett, W.F.H., Campo, M.S., O'Neil, B.W., Laird, H.M., Coggins, L.W., 1984. A novel bovine papillomavirus (BPV-6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: a member of a proposed new BPV subgroup. *Virology* 136, 255-264.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
- Kumar S., Tamura K., Nei M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 150-163.
- Maeda, Y., Shibahara, T., Wada, Y., Kadota, K., Kanno, T., Uchida, I., Hatama, S., 2007. An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. *Vet. Microbiol.* 121, 242-248.
- Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shinozaki, H.K., Kaiho, I., Shirasawa, H., 2004. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and health teat skin. *J. Gen. Virol.* 85, 2191-2197.
- Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shirasawa, H., 2007. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J. Gen. Virol.* 88, 1934-1938.

- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 3rd edn,
- Santos, R.C.S., Lindsey, C.J., Ferraz, O.P., Pinto, J.R., Mirandola, R.S., Benesi, F.J., Birgel, E.H., Pereira, C.A.B., Beçak, W., 1998. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *J. Gen. Virol.* 79, 2127-2135.
- Tomita, Y., Literák, I., Ogawa, T., Jin, Z., Shirasawa, H., 2007. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes* 35, 243-249.
- Wosiacki, S.R., Barreiros, M.A.B., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2005. Semi-Nested-PCR for detection and typing of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *J. Virol. Methods* 126, 215-219.
- Wosiacki, S.R., Claus, M.C., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2006. Bovine papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 635-638.

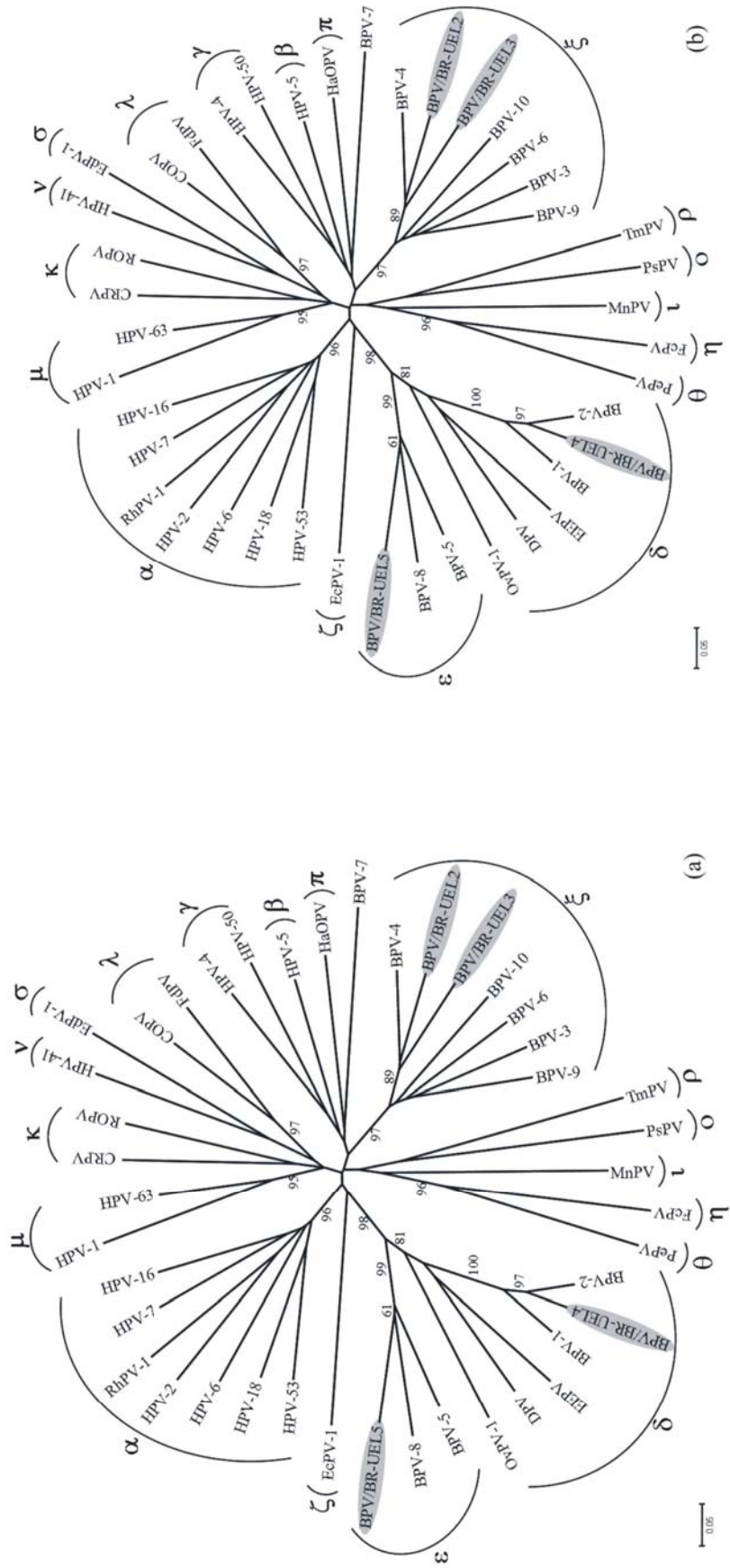


Figure 1. (a) Neighbour-joining phylogenetic tree reconstructed with FAP sequences of BPV/BR-UJEL2 to -5, and 39 human and animal PVs classified in genus *Alphapapillomavirus* to *Sigmampapillomavirus*. (b) Phylogenetic tree with FAP sequences of previously described BPV types, and putative new BPV types, including those of BPV/BR-UJEL2 to -5. The tree is divided into the previously determined genera *Deltapapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus*, *Xipapillomavirus*, and an unassigned PV genus (BPV-7). The numbers in internal nodes represent the bootstrap support values determined for 1000 replicates. The BPV/BR-UJEL2, -3, -4, and -5 are indicated by shading.

Table 1. Some lesion characteristics and the highest similarity percentage of Brazilian putative new bovine papillomavirus types with the BPV-1 to 10.

Herd	Papilloma specimen / character		BPV strain	Nucleotide sequence data		
	Gross aspect	Location		Length (bp)	Closest related	Similarity (%)
1	rice-grain	axilla	BPV/BR-UEL2	475	BPV-4	77
2	flat and round	teat	BPV/BR-UEL3	469	BPV-4	78
	frond	scapula	BPV/BR-UEL5	469	BPV-8	77
3	frond	ear and neck	BPV/BR-UEL4	440	BPV-2	88
4	frond	tail	BPV/BR-UEL4	440	BPV-2	88

3.2. THE NEW BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPE 8, RECENTLY DESCRIBED IN ASIA AND EUROPE, ALSO FOUND IN THE AMERICAN CONTINENT

Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*

The new bovine papillomavirus type 8, recently described in Asia and Europe, also found in the American continent

ABSTRACT.-|**The new bovine papillomavirus type 8, recently described in Asia and Europe, also found in the American continent.**| Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Cx. Postal 6001, Campus Universitário, Londrina, PR 86051-990, Brazil. E-mail: alfieri@uel.br

Bovine papillomavirus type 8 (BPV-8) was first detected from papillomas as well as healthy teat skin from cattle raised in Japan. Its entire genome sequence was determined in 2007. Additionally, a variant of BPV-8, BPV-8-EB, was also identified from papillomatous lesions of a European bison maintained in Slovakia. In Brazil, despite the high frequency of BPV infection, the identification of BPV types in cattle herds is still sporadic. The aim of the current study is to report the occurrence of the recently described BPV-8 in South America. The papilloma specimen was collected from a beef cattle herd from the southern region of Brazil. The macular, non-verrucous, cutaneous papilloma was located on the dorsal thorax of a cow. A polymerase chain reaction (PCR) assay was performed using degenerate primers, and the PCR product was cloned. Two selected clones were sequenced. The nucleotide sequence was compared to existing papillomaviral genomic sequences, identifying the PV as BPV type 8. This study suggests that the BPV-8, recently described in Asia and Europe, may have a worldwide distribution.

INDEX TERMS: Bovine papillomavirus type 8; cattle; cutaneous papillomatosis; molecular analysis.

RESUMO.- O papilomavírus bovino tipo 8 (BPV-8) foi detectado primeiramente em amostras de papilomas e em pele saudável de tetos de bovinos provenientes do Japão. Em 2007, a seqüência genômica completa do BPV-8 foi determinada. Ainda em 2007, uma variante do BPV-8 (BPV-8-EB) foi identificada em lesões papilomatosas de um bisão europeu mantido na Eslováquia. No Brasil, apesar da infecção pelo BPV apresentar alta freqüência em bovinos, a identificação dos tipos virais ainda é esporádica. Este estudo teve o objetivo de relatar a ocorrência do BPV-8 também no continente Americano. A amostra clínica foi obtida em um rebanho de corte proveniente da região sul do Brasil. O papiloma cutâneo, de aspecto macular e não-verrucoso, estava localizado na região dorsal torácica do animal. A identificação do vírus foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* genéricos. O produto amplificado com aproximadamente 480 pb foi clonado e plasmídeos extraídos de dois clones foram seqüenciados. A comparação da seqüência de nucleotídeos com a de outros papilomavírus demonstrou 100% de identidade com o BPV-8. Este resultado sugere que o BPV-8, recentemente descrito nos continentes Asiático e Europeu, possa ter distribuição mundial.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: bovino, papilomatose cutânea, papilomavírus bovino tipo 8, análise molecular.

INTRODUCTION

Molecular techniques have provided great advances in the understanding of papillomaviral epidemiology. The partial analysis of papillomavirus (PV) L1 gene by polymerase chain reaction (PCR) assay with degenerate primers and sequencing of amplicons has allowed rapid identification of PV types in human and animal hosts. This strategy also enabled the detection of new types and putative new types of bovine papillomavirus (BPV) in cutaneous warts as well as healthy skin of cattle worldwide (Manos et al. 1989, Antonsson & Hansson, 2002, Ogawa et al. 2007, Tomita et al. 2007).

While hundreds of human papillomavirus (HPV) types have been identified, only six BPV types had been characterized until the early 1980s (Jarret et al. 1984, Bernard 2005). However, recent studies employing PCR with general primers FAP59/FAP64 in combination with cloning and sequencing, have described 15 putative new BPV types (Forslund et al. 1999, Antonsson & Hansson 2002, Ogawa et al. 2004).

In 2007, the complete genome sequence of a new BPV type (BPV-8) was determined. Based on the FAP59/FAP64 amplicon sequence, this virus was previously designated as a putative new BPV type, named BAPV2, by the same research group. BPV-8 was first detected from papillomas as well as healthy teat skin from cattle in Japan. In addition, the BPV-8-EB, a variant of BPV-8, was detected in papillomatous lesions of a European bison from Slovakia, demonstrating that this new BPV type was present, simultaneously, in Asia and Europe (Ogawa et al. 2004, Literák et al. 2006, Tomita et al. 2007).

In Brazil, BPV infections are endemic in beef and mainly in dairy cattle herds throughout the country. Despite the high frequency of BPV infection, the identification of BPV types in Brazilian cattle herds is still sporadic. The aim of the current study is to report

the identification of BPV-8 in a beef cattle herd from South America, and thus to suggest that this recently described BPV type could have a worldwide distribution.

MATERIALS AND METHODS

Papilloma specimen

The papilloma specimen was collected with gloves from a cow in a beef cattle herd from the Parana state, the southern region of Brazil. The macular, non-verrucous, cutaneous papilloma was located on the dorsal thorax of a cow. The skin wart was collected and the fragment of papilloma specimen was triturated in phosphate buffered saline solution (PBS pH 7.2). The suspension (10% w/v) was centrifuged for 15 min at 3000 x g at 4°C. An aliquot (250 µl) of the supernatant was treated with lysis buffer (10mM Tris; 1mM ethylenediamine tetra-acetic acid [EDTA]; 0.5% Nonidet P40; 1% SDS; and 0.2 mg/ml proteinase K). After homogenization, the sample was incubated at 56°C for 30 min.

DNA extraction

In order to extract DNA, a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidine isothiocyanate methods was performed (Alfieri et al. 2006). Briefly, the fraction of supernatant was treated with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), homogenized and heated at 56°C for 15 min (Sambrook & Russell 2001). After centrifugation at 10,000 x g for 10 min, the aqueous phase was mixed with silica/guanidine isothiocyanate (Boom et al. 1990). The DNA was eluted in 50 µl of ultrapure sterile water and kept at -20°C until use. An aliquot of ultrapure sterile water was included as negative control in the DNA extraction procedure.

PCR assay

The PCR assay was performed using the primers FAP59 (forward; 5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3') and FAP64 (reverse; 5'-CCWATATCWWHCATITCICCATC-3') (Forslund et al. 1999) with slight modifications (Claus et al. 2007). Reaction was carried out in a solution containing 5 µl of the extracted DNA and 45 µl of PCR-mix consisting of 1 µl (20pmol) of each primer; 200 µM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP); 2.5 units of *Platinum Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, USA); 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, and 50 mM KCl); 1.5 mM MgCl₂, and ultrapure sterile water, to a final volume of 50 µl. Amplification was performed in a thermocycler, using the following amplification conditions: an initial step of 10 min at 94°C followed by 40 cycles of 1 min at 94°C; 1 min at 50°C, and 1 min at 72°C, and a final extension step of 10 min at 72°C. The amplified product was analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel in TBE buffer pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA) at constant voltage (90V) for approximately 45 min, stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml), and visualized under UV light.

Cloning and identity analysis

The PCR amplicon was purified (PureLink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) from agarose gel and submitted to cloning (TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Plasmid DNA from two selected clones was sequenced according to the manufacturer's instructions (MegaBACE 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequencer, GE Healthcare, Little Chalfont, Bucks, UK). Sequencing was performed in both directions by using M13 forward (F) and M13 reverse (R) primers (DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK).

Sequences were examined with the PHRED software for quality analysis of chromatogram readings. The sequences were accepted if their base quality was equal to or higher than 20. The consensus sequences were determined using the CAP3 software and sequence identity was verified with all sequences deposited in the GenBank using BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The alignment was obtained with the aid of the BioEdit software (Hall, 1999).

RESULTS

A product of approximately 480 bp was amplified from the cutaneous papilloma specimen. The negative control for PCR amplification yielded no amplified product. After primer editing, the resulting 434 bp (BPV-8: nt. 5.739-6.172) nucleotide sequence was deposited in GenBank (accession number EF635385 as BPV/BR-UEL1). In addition, by nucleotide sequence comparison, it was demonstrated that both sequences from clones were identical and that the BPV identified from the cutaneous wart was 100% identical to the BPV-8 sequence from Asia and Europe (figure 1).

DISCUSSION

To date, more than 200 HPV types have been identified (Bernard 2005). In contrast, only ten BPV types have been described at present, the majority being characterized in the early 1980s. Of these ten BPV types, three had so far been identified in Brazil. BPV-1 was found in cutaneous warts, peripheral blood, and plasma specimens, while the BPV-6 was detected in cutaneous papillomas (Santos et al. 1998, Freitas et al. 2003, Claus et al. 2007). Furthermore, DNA from BPV-2 was identified in whole blood and urinary bladder from cattle with

enzootic haematuria, and in cutaneous papillomatosis (Wosiacki et al. 2005, 2006, Claus et al. 2007).

Degenerate PCR primers have enabled the detection of a broad range of HPV types in a single PCR assay (Manos et al. 1989, Forslund et al. 1999). These primers have also been applied to papillomas from animal species and have allowed the identification of putative new PV types. The use of FAP59 and FAP64 primers has demonstrated the existence of putative new BPV types in Sweden (BAA1 to -5) and Japan (BAPV1 to -10) (Antonsson & Hansson 2002, Ogawa et al. 2004). A Japanese isolate, initially represented by a partial sequence of L1 gene, was recently defined as a new BPV type (GenBank accession number: DQ098913) through characterization of the whole genome by direct sequencing (Tomita et al. 2007).

The identity analysis of the 434 bp nucleotide sequence of the Brazilian isolate (BPV/BR-UEL1) revealed a 100% similarity with the BPV-8 described in Japan. However, whilst BPV-8 was detected in both teat papillomas and healthy teat skin swabs in Japan (Ogawa et al. 2004), BPV-8 was identified in the current study in a different anatomic location (dorsal thorax). In agreement with the current findings, a variant of BPV-8, designated BPV-8-EB, was also identified in a non-teat papilloma from a European bison (Literák et al. 2006, Tomita et al. 2007). These findings may suggest that BPV-8 does not have a predilection for a specific anatomical location.

In contrast to many RNA viruses, PV genomes seem to be very stable and the occurrence of genetic changes, such as mutation or recombination, is an uncommon event. In addition, it is recognized that the HPV genome evolved with similar frequency to their host genome (De Villiers et al. 2004, Bernard 2005). The identification of BPV-8 in Asia (Japan), Europe (Slovakia), and South America (Brazil), within a short period of time, suggests the previous existence of BPV-8 and its worldwide distribution. The fact that there had been few studies involving BPV molecular characterization could have led to BPV-8 remaining

undetected before 2007. The result of the current study suggest that the low diversity observed in BPV (BPV-1 to BPV-10) until now is more due to limited research using bovine host than the consequence of a discrete diversity in the BPV genome. The recent publications in BPV research suggest that this virus can be as diverse as HPV, and emphasize the importance of new investigations involving the molecular epidemiology of BPV infections in beef and dairy cattle herds around the world.

REFERENCES

- Alfieri A.A., Parazzi M.E., Takiuchi E, Médice K.C. & Alfieri A.F. 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop. Anim. Health Prod.* 38:521-526.
- Antonsson A. & Hansson B.G. 2002. Healthy skin of many species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J. Virol.* 76(24):12537-12542.
- Bernard H.U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* 32:1-6.
- Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L, Wertheim-Van Dillen P.M.E & Noordaa J. Van Der. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495-503.

- Claus M.P., Vivian D., Lunardi M., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. 2007. Phylogenetic analysis of bovine papillomavirus associated with skin warts in cattle herds from the state of Paraná. *Pesq. Vet. Bras.* 27(7):314-318.
- De Villiers E-M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H-U., & Zur Hausen H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
- Forslund O., Antonsson A., Nordin P. & Hansson B.G. 1999. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J. Gen. Virol.* 80:2437-2443.
- Freitas A.C., Carvalho C., Brunner O., Birgel-Jr E.H., Dellalibera A.M.M.P., Benesi F.J., Gregory L., Beçak W. & Santos R.C.S. 2003. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Braz. J. Microbiol.* 34:76-78.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41:95-98.
- Jarrett W.F.H., Campo M.S., O'Neil B.W., Laird H.M. & Coggins L.W. 1984. A novel bovine papillomavirus (BPV-6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: a member of a proposed new BPV subgroup. *Virology* 136:255-264.
- Literák I., Tomita Y., Ogawa T., Shirasawa H., Smíd B., Novotný L. & Adamec M. 2006. Papillomatosis in a European bison. *J. Wildl. Dis.* 42:149-153.

- Manos M.M., Ting Y., Wright D.K., Lewis A.J., Broker T.R. & Wolinsky S.M. 1989. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cell* 7:209-214.
- Ogawa T., Tomita Y., Okada M., Shinozaki K., Kubonoya H., Kaiho I. & Shirasawa H. 2004. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and health teat skin. *J Gen Virol* 85:2191-2197.
- Ogawa T., Tomita Y., Okada M. & Shirasawa H. 2007. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J. Gen. Virol.* 88:1934-1938.
- Sambrook J. & Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY.
- Santos R.C.S., Lindsey C.J., Ferraz O.P., Pinto J.R., Mirandola R.S., Benesi E.J., Birgel-Jr E.H., Pereira C.A.B. & Beçak W. 1998. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *J. Gen. Virol.* 79:2127-2135.
- Tomita Y., Literák I., Ogawa T., Jin Z. & Shirasawa H. 2007. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes* 35:243-249.
- Wosiacki S.R., Barreiros M.A.B., Alfieri A.F. & Alfieri A.A. 2005. Semi-Nested-PCR for detection and typing of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *J. Virol. Methods* 126:215-219.

Wosiacki S.R., Claus M.C., Alfieri A.F., Alfieri A.A. 2006. Bovine papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101:635-638.

3.3. BOVINE PAPILLOMAVIRUS MIX-INFECTION IN CATTLE AFFLICTED BY CUTANEOUS PAPILLOMATOSIS

Short Communication

Bovine papillomavirus mix-infection in cattle afflicted by cutaneous papillomatosis

Abstract

Papillomatosis is a benign proliferative tumor of cutaneous and mucosal epithelia, commonly found in cattle. In Brazil, in spite of the breeding management, the bovine papillomavirus (BPV) infections in beef and mainly in dairy cattle herds are widespread throughout the country. Until now, only ten BPV types (BPV-1 to -10) are recognized. Nevertheless, in the last years, twelve putative new BPV types were described. Despite the high frequency of BPV infection, the identification of BPV types in Brazilian cattle herds is still sporadic. The aim of this study is to describe mix-infection with different BPV types causing skin warts in the same animal. Fifteen papilloma specimens were collected from at least two different body sites from six bovines belonging to three herds from Paraná state, the southern region of Brazil. For DNA extraction a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidine isothiocyanate methods was performed. The PCR technique was carried out using the consensus primer FAP59/FAP64 that amplifies a fragment with approximately 480 bp of the papillomavirus L1 gene. All PCR products were submitted to direct sequencing. For the amplicons whose prior analysis revealed them as a putative new BPV type, a cloning was carried out. A further sequencing, employing the plasmid DNA from two selected clones of each sample, was performed. PV DNA was detected in all DNA samples from the 15 papilloma specimens evaluated. The analysis of these papilloma specimens from six animals allowed the identification of both four previously described BPV types (BPV-1, -2, -6, and -8) and three putative new BPV types (BPV/BR-UEL3, BPV/BR-UEL4, and BPV/BR-UEL5), in different mix infection patterns. Although the BPV-6 has been frequently associated with papillomas from teat, in this study we observed that a same BPV type could determine lesions with different macroscopical aspects in distinct anatomical sites. Our results suggest that the papillomavirus mix-infection can be so frequent in bovine as in human beings.

Keywords: cattle, cutaneous papillomatosis, bovine papillomavirus; mix-infection

Introduction

Papillomatosis is a benign proliferative tumor of cutaneous and mucosal epithelia, commonly found in cattle. The disease affects mainly young animals up to two years, however all ages are subjected to develop such lesions (Campo and Jarret., 1994; Jelínek and Tachezy, 2005). In Brazil, in spite of the breeding management, the bovine papillomavirus (BPV) infections in beef and mainly in dairy cattle herds are widespread throughout the country (Claus et al., 2007).

The skin warts in cattle herds are a health problem with economic consequences. In the generalized cutaneous papillomatosis the animal growth can be compromise and secondary bacterial infections are frequent. Bovine teat papilloma predispose to mastitis and to precocious rule out of a heifer or cow (Bloch et al., 1997; Campo, 2002).

The BPV, the etiological agent of the cutaneous papillomatosis, is a member of *Papillomaviridae* family. The virion is small, 52-55 nm diameter, nonenveloped, icosahedral, and resistant to the environment conditions. The genome of circular double-stranded DNA consist of approximately 8000 base pairs, divided into the early and late genes, and the L1 ORF is the most conserved region (Howley and Lowy, 2001; Bernard, 2005).

In spite of the genus, viral types and species diversity found in the *Papillomaviridae* family, until now, only ten BPV types (BPV-1 to -10) are recognized (de Villiers et al., 2004; Tomita et al., 2007; Ogawa et al., 2007; Hatama et al., 2008). Nevertheless, in the last years, twelve putative new BPV types were described (Antonsson and Hansson, 2002; Ogawa et al., 2004). Despite the high frequency of BPV infection, the identification of BPV types in Brazilian cattle herds is still sporadic (Claus et al., 2007).

The BPV immunity is type-specific and the immune status of the affected animals is a crucial factor in BPV infections (Nicholls and Stanley, 2000). Human being is the most studied host and frequently are related infections with multiples types of human

papillomavirus (HPV) (Kay et al., 2002; Doorbar, 2005). However, in the veterinary medicine, studies carried out for evaluate both the BPV typing and the BPV infection incidence is still sporadic.

The aim of this study is to describe mix-infection with different BPV types causing skin warts in the same animal.

Materials and Methods

Fifteen papilloma specimens were collected from at least two different body sites from six bovines belonging to three herds from Paraná state, the southern region of Brazil. The clinical specimens were taken by hand (wearing gloves, changed for each sample), packed individually and maintained at 4°C until performing DNA extractions. Fragments of each skin wart were triturated in phosphate buffered saline solution (PBS pH 7.2), and suspensions (10% w/v) were centrifuged for 15 min at 3000 x g at 4°C. Aliquots (250 µl) of the supernatant were treated with lysis buffer [10mM Tris; 1mM EDTA; 0.5% Nonidet P40; 1% SDS; and 0.2 mg/ml proteinase K (Invitrogen, Life Technologies, USA)]. After homogenization, samples were incubated at 56°C for 30 min.

For DNA extraction a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidine isothiocyanate methods was performed, according to Alfieri et al. (2006). Briefly, supernatants were treated with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), homogenized and heated at 56°C for 15 min (Sambrook and Russell, 2001). After centrifugation at 10,000 x g for 10 min, the aqueous phase was mixed with silica/guanidine isothiocyanate (Boom et al., 1990). The DNA was eluted in 50 µl of ultrapure (MilliQ®) sterile water and kept at -20°C until use. Aliquots of ultrapure sterile water were included as negative control in the DNA extraction procedures.

The PCR technique was carried out using the primer pair FAP59 (forward; 5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3') and FAP64 (reverse; 5'-CCWATATCWWHCATITCICCATC-3') according to Forslund et al. (1999), with slight modifications described by Claus et al. (2007). Aliquots of 5 µl from the PCR products were analysed by electrophoresis in 2% agarose gel in TBE buffer pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA) at constant voltage (90V) for approximately 45 min, stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml), and visualized under UV light.

Initially, all PCR products were purified using PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Life Technologies, USA). After that, a direct sequencing was performed by using the DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences, UK) with FAP59 and FAP64 primers, in a MegaBACE 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequencer (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), according to the manufacturer's instructions.

The obtained sequences were examined with the software PHRED for quality analysis of chromatogram readings. The sequences were accepted if base quality was equal to or higher than 20. Consensus sequences were determined by the CAP3 software and the sequence identity was verified with all sequences deposited in the GenBank using the BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

For the amplicons whose prior analysis revealed them as a putative new BPV type, a cloning using the TOPO TA Cloning kit for Sequencing (Invitrogen, Life Technologies, USA) was carried out according to the manufacturer's instructions. A further sequencing, employing the plasmid DNA from two selected clones of each sample, was performed in both directions, using M13 forward and reverse primers. The alignment was obtained by BioEdit software (Hall, 1999).

Results and discussion

Papillomavirus (PV) DNA was detected in all DNA samples from the 15 papilloma specimens evaluated by using the FAP PCR, resulting in bands with approximately 480 bp size. Besides, the negative control for PCR amplification resulted in no amplified product. The analysis of these papilloma specimens from six animals allowed the identification of both four previously described BPV types (BPV-1, -2, -6 and -8) and three putative new BPV types (BPV/BR-UEL3, BPV/BR-UEL4, and BPV/BR-UEL5), in different mix infection patterns (table 1).

Mix-infections with two types different BPV types were identified in four (A, B, D, and E) of the six animals included in the study. In animal F, from which three skin warts were analyzed, two diverse BPV types could be detect. Regarding the animal C, in which four different cutaneous lesions were taken, three BPV types were identified. In animals C, D, and F at least one of identified BPV types was a putative new BPV type. Therefore, we could identify five different combinations of mix-infection occurring in six animals. This result clearly shows the multiplicity of the BPV infections in the animals and herds evaluated.

The cattle herds included in this evaluation were from distinct geographical regions of Paraná state, distant to each other approximately 200 kilometers. Moreover, the papilloma specimens were collected during a period of two years. Given the geographical and temporal characteristics of our sampling, it is probable that the cases related in our study did not represent sporadic outbreaks of cutaneous papillomatosis. However, these results suggest that the occurrence of mix-infection by different types of BPV may be widespread throughout cattle herds from Paraná state. Since the cutaneous papillomatosis verified in different cattle herds of the country displays similar clinical profiles, it is that mix-infections often occur in other Brazilian geographical regions.

Although the BPV-6 has been frequently associated with papillomas from teat, in this study we observed that a same BPV type could determine lesions with different macroscopical aspects in distinct anatomical sites (Campo, 2002; Ogawa et al., 2004; Maeda et al., 2007).

Nowadays the use of PCR assay with consensus primers for the L1 gene followed by sequencing has been allowed the fast identification of PV types and putative new PV types in human and animals hosts. In addition to the singular infections, this strategy has also been providing the identification of mix-infections and of co-infection by distinct PV types in the same hosts and even in the same papilloma specimen (Forslund et al., 1999; Antonsson and Hansson, 2002; Ogawa et al., 2004; Maeda et al., 2007; Claus et al., 2008, submitted).

In Brazil, despite the high frequency of skin warts in bovines, studies involving both the BPV type identification and evaluation of BPV infections prevalence are uncommon. Besides, the few studies which aimed for genotyping of BPVs were based on PCR assay with type-specific primers (Santos et al., 1998; Wosiacki et al., 2005). In this case the mixed and co-infections were not identified. In the first study involving the use of general PCR assay for detection of BPV types in Brazilian cattle herds, despite the relatively small number of papillomas evaluated, it was possible the identification of BPV-1, -2, and -6 (Claus et al., 2007).

The occurrence of BPV mix-infection in different tumors collected from a same patient has been pointed by investigations in human being (Astori et al., 1997; Bens et al., 1998; Kay et al., 2002). On the other hand, studies aiming for identification of BPV types involved in different tumors from individual animals have not been performed (Ogawa et al., 2004; Maeda et al., 2007).

In the current study, the strategy adopted to evaluate cutaneous lesions of diverse anatomical areas of the same animal, allowed the identification of mix-infection with two or

even three BPV types in distinct cattle herds. These results suggest that the papillomavirus mix-infection can be so frequent in bovine as in human beings. In addition to the epidemiological importance, the identification of BPV mix-infections may contribute on understanding of clinical, pathological and immunological feature of the cutaneous papillomatosis. Then, treatment, control, and prophylaxis measures can be assess.

Table 1. Distribution of bovine papillomavirus types found in mix infections.

Herd	Animal	Papilloma specimen / character		BPV type
		Macroscopic	Localization	
1	A ¹	rice-grain	crest	1
		rice-grain	teat	6
1	B ²	flat and round	dorsal thorax	1
		flat and round	scapula	2
1	C ¹	rice-grain	chest	6
		rice-grain	teat	8
		flat and round	scapula	8
		flat and round	dorsal thorax	BPV/BR-UEL3
1	D ²	cauliflower	body	6
		cauliflower	teat	BPV/BR-UEL5
2	E ²	cauliflower	neck	1
		cauliflower	scapula	2
3	F ¹	rice-grain	neck	2
		cauliflower	dorsal thorax	2
		frond	tailhead	BPV/BR-UEL4

¹adult; ²weaned

References

- Alfieri, A.A.; Parazzi, M.E.; Takiuchi, E.; Médici, K.C.; Alfieri, A.F. 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.38, p.521-526.
- Antonsson, A.; Hansson, B.G. 2002. Healthy skin of many species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J. Virol.*, v.76, p.2537-12542.
- Astori, G.; Arzese, A.; Pipan, C.; de VILLIERS, E-M.; Botta, G.A. 1997. Characterization of a putative new HPV genomic sequence from a cervical lesion using L1 consensus primers and restriction fragment length polymorphism. *Virus Res.*, v.50, p.57-63.
- Bens, G.; Wieland, U.; Hofmann, A.; Höpfl, R.; Pfister, H. 1998. Detection of new human papillomavirus sequences in skin lesions of a renal transplant recipient and characterization of one complete genome related to epidermodysplasia verruciformis-associated types. *J. Gen. Virol.*, v.79, p.779-787.
- Bernard, H.U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* v.32, p.1-6.
- Bloch, N.; Sutton, R.H.; Breen, M.; Spradbrow, P.H. 1997. Identification of papillomaviruses in scrapings from bovine warts by use of the polymerase chain reaction. *Vet. Res. Com.*, v.21, p.63-68.

- Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-Van Dillen, P.M.E.; Noordaa, J. Van Der. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* v.28, p.495-503.
- Campo, M.S.; Jarret, W.F. Vaccination against cutaneous and mucosal papillomavirus in cattle. 1994. *Ciba Found Symposium*, n.187, p.61-73.
- Campo, M.S. 2002. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res.*, v.89, n.2, p.249-261.
- Claus, M.P.; Vivian, D.; Lunardi, M.; Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A. 2007. Phylogenetic analysis of bovine papillomavirus associated with skin warts in cattle herds from the state of Paraná. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.314-318.
- Claus, M.P.; Lunardi, M.; Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A. 2008. A bovine teat papilloma specimen harboring two types of the bovine papillomavirus. Submitted.
- de Villiers, E-M.; Fauquet, C.; Broker, T.R.; Bernard, H.-U.; zur Hausen, H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, v.324, p.17-27.
- Doorbar, J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J. Clin Virol*, v.32, p.7-15.
- Forslund, O.; Antonsson, A.; Nordin, P.; Hansson, B.G. 1999. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J. Gen. Virol.*, v.80, p.2437-2443.

- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.*, v.41, p.95-98.
- Hatama, S.; Nobumoto, K.; Kanno, T. 2008. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *J. Gen. Virol.*, v.89, n.1, p.158-163.
- Howley, P.M., Lowy, D.R. 2001. Papillomaviruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields' Virology*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 2197-2229.
- Jelínek, F.; Tachezy, R. 2005. Cutaneous papillomatosis in cattle. *J. Comp. Path.*, v.132, p.70-81.
- Kay, P.; Meehan, K.; Williamson, A-L. 2002. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. *J. Virol. Meth.*, v.105, p.159-170.
- Maeda, Y.; Shibahara, T.; Wada, Y.; Kadota, K.; Kanno, T.; Uchida, I.; Hatama, S. 2007. An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. *Vet. Microbiol.*, v.121, n.3-4, p.242-248.
- Nicholls, P.K.; Stanley, M.A. 2000. The immunology of animal papillomaviruses. *Vet Immunol. Immunopathol.*, v.73, p.101-127.

- Ogawa, T.; Tomita, Y.; Okada, M.; Shinozaki, H.K.; Kaiho, I.; Shirasawa, H. 2004. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and health teat skin. *J. Gen. Virol.*, v.85, p.2191-2197.
- Ogawa, T.; Tomita, Y.; Okada, M.; Shirasawa, H. 2007. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J. Gen. Virol.*, v.88, p.1934-1938.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edn, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Santos, R.C.S.; Lindsey, C.J.; Ferraz, O.P.; Pinto, J.R.; Mirandola, R.S.; Benesi, F.J.; Birgel, E.H.; Pereira, C.A.B.; Beçak, W. 1998. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *J. Gen. Virol.*, v.79, p.2127-2135.
- Tomita, Y.; Literák, I.; Ogawa, T.; Jin, Z.; Shirasawa, H. 2007. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Gen.*, v.35, n.2, p.243-249.
- Wosiacki, S.R.; Barreiros, M.A.B.; Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A. 2005. Semi-Nested-PCR for detection and typing of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *J. Virol. Meth.*, v.126, p.215-219.

3.4. A BOVINE TEAT PAPILOMA SPECIMEN HARBORING TWO TYPES OF THE BOVINE PAPILOMAVIRUS

Short Communication

A bovine teat papilloma specimen harboring two types of the bovine papillomavirus

Abstract

The *Papillomaviridae* are a large family of small, nonenveloped, double-stranded DNA viruses with an epithelial tropism, found in most mammals and bird. Nowadays, more than 100 types of human papillomavirus (HPV) have been described in humans, but only 10 types of bovine papillomavirus (BPV-1 to -10) are characterized. The use of degenerate primers for partial amplification of L1 gene by PCR assay, allowed the description of a broad range of PV types and putative new types in both human and animals host. In human beings is relatively frequent the identification of two different HPV types in the same patient or even in the same lesion, but in veterinary medicine this finding is few researched . The aim of this study is to relate the identification of two different BPV types in the same bovine teat papilloma. The skin wart was obtained from an adult beef cow belonging to a herd with endemic cutaneous papillomatosis from Brazil. The risks of cross-contamination between lesions were minimized. The PCR assay, for L1 gene detection, was carried out using the primer pair FAP59/FAP64 followed by direct sequencing of amplicon. As it was not possible the obtaining of nucleotide sequences with satisfactory quality scores, the amplicon was cloned. The sequence analysis of 10 individual clones revealed that the 480 bp amplicon was generated by two different BPV types. The BPV-1 was detected in six clones and the BPV-6 in four clones. The nucleotide sequence of the BPV-1 and BPV-6 clones presented 100% of similarity to each other. This result show that the bovine teat papilloma analyzed harbour two BPV types being one of the genera *Deltapapillomavirus* (BPV-1) and another of the genera *Xipapillomavirus* (BPV-6). In some cattle herds the BPV infections are an important health problem and only with the determination of the BPV types evolved in single, mix or co-infection will be possible to define the more appropriate control and prophylaxis measures.

Key words: cattle, cutaneous papillomatosis, bovine papillomavirus, co-infection.

Introduction

Papillomavirus (PV) form a highly diverse group of viruses found in most mammals and bird, which infected mucous and cutaneous epithelia and induce hyperplastic lesion (Campo, 2002). However, has been reported that the PV can be detected in healthy skin from both human being and animals such as a commensal agent (Antonsson and Hansson, 2002; Ogawa et al., 2004).

The PV is a small, nonenveloped, circular double-stranded DNA viruses classified in the *Papillomaviridae* family. This virus family is complex and includes 18 genera and more than a hundred of PV types. Different genera share <60% nucleotide sequence identity in the L1 ORF and a distinct PV type is recognized when this identity is smaller than 90% (de VILLIERS et al., 2004; Bernard, 2005).

More than 100 types of human papillomavirus (HPV) have been described in humans, while only about a set of ten types are confirmed in animal hosts (de Villiers et al., 2004). Probably this is a reflex of a bias in research efforts rather than a true difference in viral diversity (Chan et al., 1997).

In spite of bovine is the animal specie with more characterized PV types, nevertheless is much less when compared with HPV. However, last studies has been suggested that the same viral diversity observed in humans could be occurs in bovines. Nowadays are known just 10 types of bovine papillomavirus (BPV-1 to -10) that are classified in the genera *Deltapapillomavirus* (BPV-1 and -2), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 and -8), *Xipapillomavirus* (BPV-3, -4, -6, -9, -10), and one unassigned genus (BPV-7) (de Villiers et al., 2004; Ogawa et al., 2007; Tomita et al., 2007; Hatama et al., 2008).

In recent years with the strategy of the L1 gene partial amplification with degenerated primers in PCR assay and sequencing of the amplicon, a broad range of PV types and also

putative types in humans and animals host has been described (Forslund et al., 1999). In bovines, these tools provide the identification of four new BPV types in the last year (Ogawa et al., 2007; Tomita et al., 2007; Hatama et al., 2008). In addition, putative BPV types were identified in papilloma and health skin in cattle herds from Sweden, Japan, and Brazil (Antonsson and Hansson, 2002; Ogawa et al., 2004; Claus et al., 2008a, submitted).

In human host is relatively common the identification of two different HPV types in the same patient or even in the same lesion (Berkhout et al, 1995; Kay et al., 2002). In veterinary medicine the identification of mixed infections with different BPV types is not frequent (Antonsson and Hansson, 2002; Ogawa et al., 2004; Claus et al., 2008b submitted).

The aim of this work is to relate the identification of co-infection with two different BPV types in the same bovine teat papilloma.

Material and Methods

The skin wart was obtained from an adult beef cow belonging to a herd with endemic cutaneous papillomatosis from northern region of Paraná state, South region of Brazil. To minimize the risks of cross-contamination between lesions the following precautions were taken: i) the sample was obtained by hand with gloves, stored without contact to any other papilloma specimen and kept in storage individually until the process; ii) all materials used in the analysis were sterilized. The papilloma specimen was ground in phosphate-buffered saline (PBS pH 7.2), and suspension (10-20% w/v) was centrifuged for 15 min at 3000 *g* at 4°C. Aliquot (250 µl) of the supernatant was treated with lysis buffer [10mM Tris; 1mM EDTA; 0.5% Nonidet P40; 1% SDS; and 0.2 mg/ml proteinase K (Invitrogen, Life Technologies, USA)]. After homogenization, the sample was incubated at 56°C for 30 min. For DNA extraction a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidine

isothiocyanate methods was carried out according to Alfieri et al. (2006). Briefly, the sample was treated with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1), homogenized and heated at 56°C for 15 min (Sambrook and Russell, 2001). After centrifugation at 10,000 g for 10 min, the aqueous phase was processed according to silica/guanidine isothiocyanate method (Boom et al., 1990). The DNA was eluted in 50 µl of ultrapure (MilliQ[®]) sterile water and kept at -20°C until use. An aliquot of ultrapure sterile water was included as negative control in the DNA extraction procedure.

The PCR technique was carried out using the primer pair FAP59 (forward; 5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3') and FAP64 (reverse; 5'-CCWATATCWWHCATITCICCATC-3') according to Forslund et al. (1999), with slight modifications according to Claus et al., 2007.

The resulted PCR product was purified by using PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, Life Technologies, USA). Initially, a direct sequencing, employing the FAP59 and FAP64 primers, was performed by using the DYEnamic ET dye terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences, UK), in a MegaBACE 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequencer (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), according to the manufacturer's instructions. As we did not get nucleotide sequences with satisfactory quality scores, the amplicon was cloned using the TOPO TA Cloning kit for Sequencing (Invitrogen, Life Technologies, USA) and carried out according to the manufacturer's instructions. A further sequencing, employing the plasmid DNA from ten selected clones of the sample, was performed in both directions, using M13 forward and reverse primers.

After that, the obtained sequences were examined with the software PHRED (<http://bioinformatica.ucb.br/electro.html>) for quality analysis of chromatogram readings. The sequences were accepted if their quality readings were equal to or higher than 20. The consensus sequences were determined by the software CAP3

(<http://bioinformatics.iastate.edu/aat/sas.html>) and the sequence identity was verified with all sequences deposited in the GenBank using the BLAST software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The alignment was obtained by the BioEdit software (Hall, 1999).

Results and Discussion

The PV DNA was detected in a bovine teat papilloma specimen evaluated by the FAP59/FAP64 degenerated primers in a PCR assay resulting in a single band with high quality and approximately 480 bp length.

Despite several attempts the 480 bp amplicon do not produce adequate nucleotide sequences and the type of the BPV in the teat papilloma could not be determinate by direct sequencing. The difficulty in obtaining good sequences in the amplified product can suggest the presence of multiple type of PV in the same lesion (Maeda et al., 2007).

The sequence analysis of 10 individual clones revealed that the 480 bp amplicon was generated by two different BPV types. The BPV-1 was detected in six clones and the BPV-6 in four clones. The nucleotide sequence of the BPV-1 and BPV-6 clones, showed 100% of similarity to each other. This result confirm that the bovine teat papilloma analyze harbouring two BPV types being one of the genera *Deltapapillomavirus* (BPV-1) and another of the genera *Xipapillomavirus* (BPV-6).

In human patients are frequent the reports of co-infections with different types of HPV, mainly in immunosuppressed patient. In Brazil, multiples HPV types were detected in 161 (78.9%) specimens collected in a group of 208 human immunodeficiency virus-infected women (Levi et al., 2002). In the other study with renal transplant recipients, more than 30%

of the PCR-positive samples showed to harbour more than one HPV type (Berkhout et al., 1995).

Also in normal conditions of the immune system, co-infection could be observed in humans. The evaluation of 152 archival cervical carcinoma specimens showed a high frequency (28.9%) of multiple HPV infections (Huang et al., 2004).

The strategy of the nucleotide sequence analysis of cloned PCR products revealed five different epidermodysplasia verruciformis (EV)-HPV L1 sequences in a premalignant keratosis and three different EV-HPV DNAs in a squamous cell carcinoma (SCC) from a renal transplant recipient. Previous analyses of these biopsies by direct sequencing of PCR products identified only one HPV type (Bens et al., 1998).

In animal host Ogawa et al. (2004) described co-infections by different BPV types in cattle herds from Japan. Some cutaneous lesion and healthy skin from teats harbour multiple BPV types.

However, the analysis of healthy skin should be interpreted with caution. Many PVs appear to occur preferentially in a latent life cycle, because a wide variety of different types can be detected in the normal skin. Forslund et al. (1999) found three different HPV types from the same healthy volunteer.

Besides the great diversity of host and PV types, these viruses could determinate multiples infections in the same host and even in the same skin wart. The major impediment for the characterization of PV types is the absence of a conventional cell culture system for *in vitro* viral propagation. Thus, adequate molecular techniques are fundamental for PV infections diagnosis and PV types identification.

The L1 gene partial amplification by PCR assay with degenerate primers and sequencing of the amplicon has been providing a considerable evolution in the knowledge of the PV infections epidemiology. In some situations the strategy of PCR products cloning and

sequencing can be an important tool for the identification of co-infections. In animals the epidemiology of the PV infections is still unknown worldwide even in bovine that is the more studied host. In some cattle herds the BPV infections are an important health problem and only with the determination of the BPV types evolved in single, mix or co-infection will be possible to define the more appropriate control and prophylaxis measures.

References

- Alfieri, A.A.; Parazzi, M.E.; Takiuchi, E.; Médici, K.C.; Alfieri, A.F. 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop. Anim. Health Prod.*, v.38, p.521-526.
- Antonsson, A.; Hansson, B.G. 2002. Healthy skin of many species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J. Virol.*, v.76, p.2537-12542.
- Bens, G.; Wieland, U.; Hofmann, A.; Höpfl, R.; Pfister, H. 1998. Detection of new human papillomavirus sequences in skin lesions of a renal transplant recipient and characterization of one complete genome related to epidermodysplasia verruciformis-associated types. *J. Gen. Virol.*, v.79, p.779-787.
- Berkhout, R.J.M.; Tieben, L. M.; Smiths, H.L.; Bouwes Bavinck, J.N.; Vermeer, B.J.; ter Schegget, J. 1995. Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.*, v.33, p.690-695.

- Bernard, H.U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J. Clin. Virol.* v.32, p.1-6.
- Boom, R.; Sol, C.J.A.; Salimans, M.M.M.; Jansen, C.L.; Wertheim-Van Dillen, P.M.E.; Noordaa, J. Van Der. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* v.28, p.495-503.
- Campo, M.S. 2002. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res.*, v.89, n.2, p.249-261.
- Chan, S-Y.; Bernard, H-U.; Ratterree, M.; Birkebak, T.A.; Faras, A.J.; Ostrow, R. 1997. Genomic diversity and evolution of papillomaviruses in rhesus monkeys. *J. Virol.*, v.71, n.7, p.4938-4943.
- Claus, M.P.; Vivian, D.; Lunardi, M.; Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A. 2007. Phylogenetic analysis of bovine papillomavirus associated with skin warts in cattle herds from the state of Paraná. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.314-318.
- Claus, M.P; Lunardi, M.; Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A. 2008a. Putative new bovine papillomavirus types in cutaneous papillomatosis. Submitted
- Claus, M.P; Lunardi, M.; Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A. 2008b. Bovine papillomavirus mix-infection in cattle afflicted by cutaneous papillomatosis. Submitted.

- de Villiers, E-M.; Fauquet, C.; Broker, T.R.; Bernard, H.-U.; zur Hausen, H. 2004. Classification of papillomaviruses. *Viol.*, v.324, p.17-27.
- Forslund, O.; Antonsson, A.; Nordin, P.; Hansson, B.G. 1999. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *J. Gen. Virol.*, v.80, p.2437-2443.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp.*, v.41, p.95-98.
- Hatama, S.; Nobumoto, K.; Kanno, T. 2008. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *J. Gen. Virol.*, v.89, n.1, p.158-163.
- Huang, L-W.; Chao, S-L.; Chen, P-H.; Chou, H-P. 2004. Multiple HPV genotypes in cervical carcinomas: improved DNA detection and typing in archival tissues. *J. Clin. Virol.*, v.29, p.271-276.
- Kay, P.; Meehan, K.; Williamson, A-L. 2002. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. *J. Virol. Meth.*, v.105, p.159-170.

- Levi, J.E.; Kleter, B.; Quint, W.G.V.; Fink, M.C.S.; Canto, C.L.M.; Matsubara, R.; Linhares, I.; Segurado, A.; Vanderborght, B.; Eluf Neto, J.; van Doorn, L-J. 2002. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiples HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, n.9, p.3341-3345.
- Maeda, Y.; Shibahara, T.; Wada, Y.; Kadota, K.; Kanno, T.; Uchida, I.; Hatama, S. 2007. An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. *Vet. Microbiol.*, v.121, n.3-4, p.242-248.
- Ogawa, T.; Tomita, Y.; Okada, M.; Shinozaki, H.K.; Kaiho, I.; Shirasawa, H. 2004. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and health teat skin. *J. Gen. Virol.*, v.85, p.2191-2197.
- Ogawa, T.; Tomita, Y.; Okada, M.; Shirasawa, H. 2007. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J. Gen. Virol.*, v.88, p.1934-1938.
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edn, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Tomita, Y.; Literák, I.; Ogawa, T.; Jin, Z.; Shirasawa, H. 2007. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Gen.*, v.35, n.2, p.243-249.

4 CONCLUSÕES

- A PCR, realizada com os *primers* genéricos FAP59/FAP64, foi eficaz na amplificação de um produto com aproximadamente 480 pb do gene L1 do BPV a partir de papilomas cutâneos bovinos;
- O estudo da diversidade, realizado a partir das seqüências de nucleotídeos dos produtos amplificados pela PCR, proporcionaram a identificação de tipos clássicos de papilomavírus bovino (BPV-1; -2; e -6);
- A clonagem e o seqüenciamento de produtos amplificados pela PCR permitiram a definição do tipo viral presente em amostras de papilomas com resultados anteriores inconclusivos;
- A identificação pela primeira vez no continente Americano do BPV-8, tipo viral recentemente descrito na Ásia e Europa sugere a sua distribuição mundial;
- O número reduzido de tipos de BPV descritos na literatura mundial pode não representar a diversidade desse vírus na natureza uma vez que em uma amostragem, constituída por apenas 22 papilomas cutâneos, foi possível a identificação de 4 supostos novos tipos virais;
- Em rebanhos bovinos da região norte do Estado do Paraná as formas de infecção pelo BPV apresentaram-se complexas, tendo sido identificadas infecções simples (apenas um tipo viral), mistas (mais de um tipo viral no mesmo animal), e co-infecções (dois tipos virais na mesma lesão);
- A diversidade de tipos virais e de formas de infecção encontradas nesse estudo demonstra a complexidade etiológica da papilomatose cutânea bovina.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Lista de Reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 µL; 25µmol each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies®)
2. 10 x PCR-Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies®)
3. 123 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies®)
4. 2-Mercapto-ethanol (C₂H₆O₅) P.M. 78,13 (Fluka®)
5. Acetona, P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
6. Ácido acético glacial, P.A. (CH₃COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)
7. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83
8. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
9. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂H₂O) P.M. 372,24 (Reagen®)
10. Agarose (Gibco BRL®)
11. Ágar - Himedia Laboratories, India
12. Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
13. Álcool isoamílico ((CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth®)
14. Ampicilina trihidratada - USB, Cleveland, Ohio
15. Azul de bromofenol (Sigma®)
16. Cloreto de Potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)
17. Cloreto de Sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
18. Clorofórmio, P.A. (CHCl₃) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
19. Dodecil Sulfato de Sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) P.M. 288,38 (Synth®)
20. Ethidium bromide (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma®)
21. Extrato de Levedura - USB, Cleveland Ohio
22. Gibco BRL – Concert™ Rapid Plasmid purification System - Invitrogen Life Technologies®
23. Glicina, P.A. (Nuclear®)
24. Guanidine isothiocyanate P.M. 118,16 (Gibco BRL®)
25. Hidróxido de Sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica®)

26. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab®)
27. Lambda DNA - (Invitrogen Life Technologies®)
28. Metanol, P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia®)
29. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies®)
30. PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen Life Technologies®)
31. REACT® 2 (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl) (Invitrogen Life Technologies®)
32. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) p.m. 342,31 (Reagen®)
33. Silicon dioxide (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma®)
34. TOPO TA Cloning kit for Sequencing (Invitrogen Life Technologies®)
35. Triton x-100
36. Triptona - Acumedia Manufacturers, Inc. Lansing, Michigan

APÊNDICE B – Soluções e Tampões

- **Hidratação da sílica**
 - 60 g de sílica (SIGMA[®])
 - Adicionar 500 mL de água MilliQ autoclavada
 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 horas
 - Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
 - Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
 - Manter em repouso durante 5 horas para sedimentar
 - Desprezar 440 mL do sobrenadante
 - Adicionar 600 µL de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH=2,0)
 - Aliquotar e autoclavar

- **Solução L6**
 - 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 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 tiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 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 []**
 - 0,89 M TRIS
 - 0,89 M ácido bórico
 - 0,02 M EDTA dissodium
 - Água bidestilada qsp. 1 litro
 - pH = 8,4

- **Tampão fosfato salina (PBS)**
 - 137 mM cloreto de sódio (NaCl)
 - 3 mM cloreto de potássio (KCl)
 - 8 mM sódio fosfato dibásico anidro (Na_2HPO_4)
 - 15 mM potássio fosfato monobásico ($\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$)
 - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 1 litro
 - pH = 7,2

- **Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (24:24:1)**
 - 24 mL fenol saturado
 - 24 mL clorofórmio
 - 1 mL álcool isoamílico

- **Meio Luria Bertani (LB) sólido para 500 mL**
 - 5 g de triptona
 - 400 mL de água destilada no homogeneizador, com barra magnética.
 - Extrato de Levedura: 2,5 g
 - 2,5 g NaCl
 - 3,25 g de ágar em cada erlenmeyer, autoclavar.
 - Completar até 500 mL (proveta).
 - Completar para 500 mL (becker).
 - Adicionar 250 mL do líquido aos 3,25 de ágar em cada erlenmeyer que será autoclavado.

- **Meio LB líquido**
 - 5 g de triptona
 - 400 mL de água destilada no homogeneizador, com barra magnética.
 - Extrato de Levedura: 2,5 g
 - 2,5 g NaCl
 - Autoclavar e distribuir em tubos de 3 mL e 5 mL

APÊNDICE C – Protocolo de Técnicas

- **Macerado de Fragmentos de Órgãos**

- Triturar 1 gr do fragmento do órgão
- Macerar o órgão com pistilo em um gral
- Adicionar 9 mL de PBS 1x
- Homogeneizar em vórtex, congelar, descongelar rapidamente por 3 vezes
- Centrifugar a 4.000 x g durante 15 min
- Recolher 500 µL do sobrenadante em eppendorf para extração de DNA

- **Lise Celular**

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

- **Extração do DNA pela técnica fenol / clorofórmio – álcool isoamílico / sílica / tiocianato 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 eppendorf
- 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/seg
- 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/seg
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g 30/seg
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M

- Adicionar 1.000 μL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g 30/seg
- Desprezar o sobrenadante
- Adicionar 1.000 μL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g 30/seg
- Desprezar o sobrenadante
- Adicionar 1.000 μL de acetona PA gelada
- 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 100 μl de água miliQ autoclavada
- Homogeneizar em vórtex
- Descansar em banho-maria à 56°C/15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g/2 min
- Recolher o sobrenadante
- Estocar a -20°C

- **Gel de agarose a 2%**

- 1 g de agarose
- 50 mL TEB 1 x
- 30 μL ethidium bromide

- **Ligação**

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

solução de DNA a ser clonado	0,5 a 4 μL (depende da quantificação)
Solução de sal	1,0 μL
H ₂ O estéril	Para volume final de 6 μL
Vetor TOPO	1,0 μL

2. Misturar a reação gentilmente e incubar por 1h.

- Colocar a reação em gelo até proceder a transformação. Pode ser estocado a -20°C *overnight*.

- Ligação do marcador ao vetor**

Vetor 10ng – 4000 kb

Nosso fragmento: 0,47 Kb

$4 : 0,47 = 8,5$ x, ou seja, o vetor é 8,5x maior que o inserto.

Se a proporção for 1:1 usa-se 8,5x menos vetor que o inserto.

Como o vetor está a 10 ng, então:

$10 \text{ ng} : 8,5x = 1,17 \text{ ng}$, mas como a proporção esperada é de 4:1, tem-se:

$1,17 \text{ ng} \times 4 = 4,70 \text{ ng}$ vetor, onde:

Quantos ng há por μL no DNA (inserto) da quantificação?

5ng / μL , então se usa 1 μL de inserto e 1 μL de vetor.

O DNA da banda possui 5 ng/ μL

5 ng(DNA) -----1 μL (volume fixo)

4,7 ng (vetor)----- X (DNA)

$X = 0,94 \mu\text{L}$ de DNA da banda e 1 μL de vetor

- Pré-inoculação**

- Descongelar a bactéria (-20°C).
- Use 2 tubos tipo “ependorfs” de células.
- Use 3mL do meio LB líquido autoclavado.
- Acrescente 15 μL de células para cada 3 mL de LB.
- Homoginize levemente o tubo com LB.
- Deixe incubando a 37°C e 180 rpm no *Shaker*, *overnight*.

- **Preparação de células competentes**

1. Após esse período diluir a pré-cultura (150 μ L em 5mL de meio LB líquido) e incubar à 37°C, 180 rpm até $DO_{600nm}=0,4-0,6$ (aproximadamente 1h).
2. Logo após, deixar o tubo em banho de gelo por 5 min.
3. Em seguida, centrifugar 3 mL da cultura em 2 tubos de microcentrífuga (1,5 mL em cada tubo), a 5000 rpm/5 min.

OBS: As células e soluções devem ser mantidas em gelo.

4. Eliminar o sobrenadante por inversão do tubo e adicionar ao precipitado 500 μ L do $CaCl_2$ 50mM, homogeneizando bem. Juntar o conteúdo dos 2 tubos em um só.
5. Deixar em banho de gelo por 10 min.
6. Centrifugar por 5 min a 5000 rpm e em seguida eliminar o sobrenadante.
7. Ressuspender as células em 300 μ L de $CaCl_2$ 50mM.
8. Deixar em banho de gelo por 20 min.
9. Aliquotar em tubos de microcentrífuga 50 μ L da células competentes e estocar a -20°C.

- **Purificação do produto excisado do gel**

1. Fazer gel de agarose a 1% (0,4 g de agarose para 40 mL de TBE 1x).
2. Colocar 5 μ L de tampão da amostra (Ficoll) para 25 μ L de produto da PCR.
3. Spin de 10000 rpm.
4. Aplique amostra no gel já dentro da cuba com o TBE 1x.
5. Deixe correr por aproximadamente 2h a 85 v.
6. Core o gel em solução de brometo de etídeo por 15 min.
7. Descore em água por 10 min (poderia deixar por até 1h).
8. Deixe o BM preparado a 50°C.
9. Pese o eppendorf vazio.
10. Corte a banda do gel.
11. Coloque a banda recortada dentro de um tubo tipo “eppendorf”, descontando o peso anterior do mesmo.
12. Adicione 30 μ L de GS1 para cada 10 mg de gel.

OBS: O GS1 só funciona em fragmentos de gel que pesem até 400 mg de gel. Se ultrapassar esse valor, dividir em dois tubos tipo “eppendorf”.

13. Incube o tubo à 50°C/15 min, misturando de 3 em 3 min.
14. Após dissolver, incube por mais 5 min.
15. Coloque a coluna em um novo tubo e pipete a mistura anterior.
16. Centrifugue por 12000 rpm/1 min.
17. Descarte a fase inferior e recoloque a coluna novamente.
18. Adicionar 700 µL de solução W9 e incube a temperatura ambiente/5 min.
19. Centrifugue a 12000 rpm/1 min.
20. Descarte a fase inferior e recoloque a coluna novamente.
21. Centrifugue a coluna a 12000 g/1 min para remover o tampão residual.
22. Colocar a coluna em outro tubo (1,5 mL).
23. Adicionar 20µL de água a 65°C no centro da coluna.
24. Incube a temperatura ambiente/2 min.
25. Centrifugue 12000 g/2 min.

- **Quantificação**

1. Faça gel de agarose a 1% para a cuba pequena (0,2 g de agarose para 20 mL de TBE 1x).
2. Prepare amostra adicionando 2µL do purificado e 2 µL do tampão de amostra.
3. Aplique no gel as amostras, 5µL do padrão de 1kb (100pb), 5µL do marcador λ de 5ng/µL e 5µL do de 15ng/µL.
4. Após esse período diluir a pré-cultura (150 µL em 5mL de meio LB líquido) e incubar à 37°C, 180 rpm até DO_{600nm}=0,4-0,6 (aproximadamente 1h).
5. Logo após, deixar o tubo em banho de gelo/5 min.
6. Em seguida, centrifugar 3 mL da cultura em 2 tubos de microcentrífuga (1,5 mL em cada tubo). A 5000 rpm/5 min.

OBS: As células e soluções devem ser mantidas em gelo.

- **Transformação**

1. Adicionar 3µL do produto da ligação a 50 µL de células competentes e colocar em banho de gelo/20 min.

Obs.: Faça isso em 2 tubos, pois um será o PUC, com 3 µL só do vetor (CTL).

2. Incubar a mistura por 2 min exatamente a 42°C em banho-maria.
3. Transferir imediatamente para banho de gelo.

4. Adicionar 1 mL de LB líquido e incubar por 1h a 37°C sob agitação (180 rpm).
5. Centrifugar a 5.000 rpm/10 min.
6. Descartar o sobrenadante.
7. Ressuspender o pellet em 100 µL de LB líquido.

Obs.: Pegar um tubo do passo 4, sem centrifugar e só com céls competentes, e ir para o passo 8, porém sem acrescentar ampicilina.

8. Incubar em 2 placas com LB sólido com 75 µg / mL de ampicilina com o auxílio da alça de Drigalsk.
9. Incubar a 37°C em estufa/24h.

- **Mini-prep - Extração do plasmídeo**

1. Em um tubo de ensaio colocar 5 µL de meio LB líquido.
2. Colocar 50 µL de ampicilina.

Amp= [] inicial= 10 mg /µL

[] final= 100 µg /µL

10 mg/ml . Vi = 100 µg /mL . 5 ml

Vi = 0,05 ml = 50 µL (em cada tubo)

3. Com um palito, retirar uma fração de bactérias e colocar dentro do tubo.
4. Deixar crescer a 37°C, 180 rpm/12 h.
5. Encher o ependorf com 1,5 mL da cultura e centrifugar a 5.000 rpm/12 min. Descartar o sobrenadante. Repetir o processo.
6. Adicionar 210 µL de G1 para ressuspender as células.
7. Adicionar 210 µL de G2 para lisar as células e verter gentilmente mais ou menos 5 vezes. Deixar 5 min a temperatura ambiente.
8. Adicionar 280 µL de G3 para neutralizar e verter gentilmente mais ou menos 5 vezes. Centrifugar a 12000 rpm/10 min.
9. Tirar o sobrenadante do ependorf e passar para a coluna e colocar a coluna dentro de outro tubo.
10. Adicionar 700 µL de G4 (tampão de lavagem com etanol) no centro da coluna. Centrifugar a 12000 rpm/duas vezes.
11. Adicionar 75 µL de TE no centro da coluna. Incubar 1 min a temperatura ambiente. Centrifugar 12000 rpm/2min.

ANEXOS

ANEXO A – Normas de Publicação no periódico *Veterinary Microbiology*

VETERINARY MICROBIOLOGY

An International Journal

Guide for Authors

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Short Communications
4. Letters to the Editor
5. Book Reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal. Of particular interest are topical, short (Mini) Reviews in areas of current interest. Instructions for the preparation of such articles are available from the Reviews Editor J. Glenn Songer (gsonger@u.arizona.edu). Prior to submitting Review papers, authors should discuss the proposed content with the Reviews Editor.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than 6 printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old.

Submission of manuscripts

Submission to *Veterinary Microbiology* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/vetmic>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent reviewing.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to: AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: http://www.cioms.ch/frame_1985_texts_of_guidelines.htm. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Veterinary Microbiology*.

Any new nucleotide or amino acid sequence data will be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank, and the accession numbers will be included in the manuscript (Methods section) before it is finally accepted for publication. In addition, it is expected that any plasmids, transposons, viruses, microbial strains, or cell lines described for the first time in the paper will be made available to scientists for non-commercial purposes at reasonable cost following publication.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts should be written in English. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Language Editing: [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Please note that Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our terms & conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

2. Manuscripts should have **(numbered lines)** with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

3. Manuscripts in general should be organized in the following order:
Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)
 Complete postal address(es) of affiliations
 Full telephone, Fax No. and E-mail of the corresponding author
 Present address(es) of author(s) if applicable
 Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent
 Abstract
 Keywords (indexing terms), normally 3 – 6 items. Please refer to the cumulative index.
 Introduction
 Material studied, area descriptions, methods, techniques
 Results
 Discussion
 Conclusion
 Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.
 References
 Tables
 Figure captions
 Tables (separate file(s))
 Figures (separate file(s))
 4. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.
 5. SI units should be used.
 6. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Abstracts

Manuscripts of original research papers should include a structured Abstract of 250 or fewer words, organised under the sections: Problem addressed; Objective; Methods and approach; Results; Conclusions. Do not actually include section headings, but use this structure for the Abstract.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files,

preferably in TIFF or EPS format.

2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.

3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible, any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.

7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.

10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

References

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. For original research papers, the list should not exceed 35 references (it may be longer for review articles).
2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed— if necessary — by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp.12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. *For periodicals*

Chin, J.C., Dai, Y., Watts, J.E., 1995. Antibody response against *Pseudomonas aeruginosa* membrane proteins in experimentally infected sheep. *Vet. Microbiol.* 43, 21–32.

b. *For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical*

Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R., Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 1–4.

c. *For books*

Armitage, P., Berry, G., 1987. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94–100, 411–416.

d. *For multi-author books*

Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), *The Ruminant Immune System*, Plenum Press, New York, pp. 3–55.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references; according to the International *List of Periodical Title Word Abbreviations*. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Microbiol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.

2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.

3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .

6. Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .

7. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being

described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other

intra-company use (e.g., training)

- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

1. The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail or, alternatively, 25 free paper offprints (100 for Review Articles). The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

2. Additional paper offprints can be ordered on an offprint order form, which is included with the proofs.

3. UNESCO coupons are acceptable in payment of extra paper offprints.

Author Services

Questions arising after acceptance of the manuscript, especially those relating to proofs,

should be directed to Elsevier Ireland, Elsevier House, Brookvale Plaza, East Park, Shannon, Co. Clare, Ireland, Tel.: (+353) 61 709600, Fax: (+353) 61 709111/113.

Authors can also keep a track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage ⇨ <http://www.elsevier.com/locate/vetmic> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

***Veterinary Microbiology* has no page charges**

ANEXO B – Normas de publicação no periódico *Pesquisa Veterinária Brasileira*

Apresentação de manuscritos

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em **Título, Abstract, Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões** (ou combinações destes três últimos), **Agradecimentos e Referências**:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho;

b) um **Abstract**, um resumo em inglês, deverá ser apresentado com os elementos constituintes observados nos artigos em português, publicados no último número da revista, ficando em branco apenas a paginação, e, no final, terá indicação dos *index terms*;

c) o **Resumo** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, dando os mais importantes resultados e conclusões; será seguida da indicação dos termos de indexação; nos trabalhos em inglês, **Resumo** e **Abstract** trocam de posição e de constituição (veja-se como exemplo sempre o último fascículo da revista);

d) a **Introdução** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

e) em **Material e Métodos** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores;

f) em **Resultados** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos; quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições; é conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos, ao invés de apresentá-los em quadros extensos;

g) na **Discussão** os resultados devem ser discutidos diante da literatura; não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

h) as **Conclusões** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

i) os **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

j) a lista de **Referências**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando os nomes de todos os autores, o título de cada publicação e, por extenso ou abreviado, o nome da revista ou obra, usando as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, *Style Manual for Biological Journals* (American Institute for Biological Sciences) e/ou *Bibliographic Guide for Editors and Authors* (American Chemical Society, Washington, D.C.).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as normas abaixo:

a) os trabalhos devem ser apresentados em uma só face do papel, em espaço duplo e com margens de, no mínimo, 2,5 cm; o texto será escrito corridamente; quadros serão feitos em folhas separadas, usando-se papel duplo ofício, se necessário, e anexados ao final do trabalho; as folhas, ordenadas em texto, legendas, quadros e figuras, serão

numeradas seguidamente;

b) a redação dos trabalhos deve ser a mais concisa possível, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados um pouco acima da linha de escrita, após a palavra ou frase que motivou a nota; essa numeração será contínua; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada; todos os quadros e todas as figuras serão mencionados no texto; estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes; Resumo e *Abstract* serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas;

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional do(s) autor(es);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de dois autores serão citados pelos nomes de ambos, e de três ou mais, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita pelo acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos; todos os trabalhos citados terão suas referências completas incluídas na lista própria (Referências), inclusive os que tenham sido consultados indiretamente; no texto não se fará menção do trabalho que tenha servido somente como fonte; este esclarecimento será acrescentado apenas ao final das respectivas referências, na forma: "(Citado por Fulano 19...)"; a referência do trabalho que tenha servido de fonte será incluída na lista uma só vez; a menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita, de preferência, no próprio texto, colocada em parênteses, com citação de nome(s) ou autor(es); nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Flores & Houssay 1917, Roberts 1963a,b, Perreau et al. 1968, Hanson 1971);

f) a lista das referências deverá ser apresentada com o mínimo de pontuação e isenta do uso de caixa alta, sublinhando-se apenas os nomes científicos, e sempre em conformidade com o padrão adotado no último fascículo da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As **figuras** (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) deverão ser apresentadas em tamanho maior (cerca de 150%) do que aquele em que devam ser impressas, com todas as letras ou sinais bem proporcionados para assegurar a nitidez após a redução para o tamanho desejado; parte alguma da figura será datilografada; a chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura; desenhos deverão ser feitos com tinta preta em papel branco liso ou papel vegetal, vedado o uso de papel milimetrado; cada figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte superior da figura; fotografias deverão ser apresentadas em branco e preto, em papel brilhante, e sem montagem, ou em diapositivos (*slides*) coloridos; somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras será em cores; para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

4. As legendas explicativas das figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis e serão apresentadas em folha separada que se iniciará com o título do trabalho.

5. Os **quadros** deverão ser explicativos por si mesmos; cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas; não há traços verticais; os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando de *a* em cada quadro, e as notas serão lançadas logo abaixo do quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto, à esquerda.

BPV-1	CC TCT
BPV-2	... T ..
BPV-3	... A ..
BPV-4	... A ..
BPV-5	.. CA ..
BPV-6	.. AT ..
BPV-7	.. AA ..
BPV-8	... A ..
BPV-9	... A ..
BPV-10	... A ..
BAPV3	... A ..
BAPV4	.. AA ..
BAPV5	.. AA ..
BAPV7	.. AA ..
BAPV8	G .. A ..
BAPV9	... A ..
BAPV10	.. CA ..
BAA1	... A ..
BAA2	... A ..
BAA3	.. AA ..
BAA4
UEL2	... A ..
UEL3	.. CA ..
UEL4	.. CT ..
UEL5	... A ..