



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRÍGIDA KUSSUMOTO DE ALCÂNTARA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE PAPILOMAVÍRUS
BOVINO IDENTIFICADOS EM SARCOIDES EQUINOS**

Londrina
2013

BRÍGIDA KUSSUMOTO DE ALCÂNTARA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE PAPILOMAVÍRUS
BOVINO IDENTIFICADOS EM SARCOIDES EQUINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

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

Londrina
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A347e Alcântara, Brígida Kussumoto de.
Epidemiologia molecular de Papilomavírus bovino identificados em sarcoides equinos / Brígida Kussumoto de Alcântara. – Londrina, 2013.
xiv, 68 f. : il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Equino – Doenças – Teses. 2. Doenças do vírus do papiloma – Teses. 3. Virose em animais – Teses. 4. Virologia veterinária – Teses. 5. Epidemiologia molecular – Teses. I. Alfieri, Alice Fernandes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.1

BRÍGIDA KUSSUMOTO DE ALCÂNTARA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE PAPILOMAVÍRUS BOVINO
IDENTIFICADOS EM SARCOIDES EQUINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. orientadora Dr^ª. Alice Fernandes Alfieri
UEL – Londrina – PR

Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros
UFPR – Palotina – PR

Prof^ª. Dr^ª. Michele Lunardi
UNIC – Cuiabá –MT

Londrina, 28 de março de 2013.

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 Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Alice Fernandes Alfieri.

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

- CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior / MEC.
- CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCTI.
- Fundação Araucária: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI-PR.
- FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCTI

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Alice Fernandes Alfieri e ao Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri, da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade, orientação, dedicação e confiança em mim. Ao Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley, da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), pela leitura do manuscrito e no auxílio do diagnóstico histopatológico.

À Prof^ª. Dr^ª. Letícia Yamasaki Buck, da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), e ao prof. Dr. Aldo Gava, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), pelo fornecimento das amostras de material parafinado.

À médica veterinária Vilma Rodrigues Almeida de Souza, residente da Universidade Estadual de Londrina, pelas coletas de sarcoide equino em Brasília, e aos professores da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), doutora Luciana Takemura e mestre José Henrique Cavicchioli, pelas coletas de amostras no Paraná e São Paulo.

Ao médico veterinário e doutorando Rodrigo A. A. Otonel, da Universidade Estadual de Londrina, pelo auxílio nas análises laboratoriais e sugestões do manuscrito.

Ao funcionário João, do Laboratório de apoio à pesquisa agropecuária (LAPA), e a médica veterinária Juliana Fritzen, do Laboratório de Virologia Animal, da Universidade Estadual de Londrina, pelo suporte técnico.

Aos médicos veterinários e colegas Elis, Raquel, Juliane, Juliana, Thaís, Bruninha, Edsel, Flávia, Lívia, Dani e, especialmente, Otonel, Michele, Wagner, Ana e Victor, todos da Universidade Estadual de Londrina, pela amizade e pelo apoio técnico e emocional em todos os momentos deste trabalho. A todos estagiários do labviral, especialmente Karina e Luana. A todos meus amigos do Parque 1, pela companhia e momentos de distração.

Aos meus pais, Benedito de Alcântara e Lioko Kussumoto de Alcântara, pelo carinho e suporte. À minha irmã, a qual eu tenho muito orgulho, Berenice Kussumoto de Alcântara, engenheira florestal e doutoranda da Universidade de São Paulo, pelo carinho, suporte e pelo fornecimento de muitos *papers*, uma das pessoas que mais me incentivou a seguir estudando.

*“Não importa o quanto a vida possa ser ruim,
sempre existe algo que você possa fazer, e triunfar”*

Stephen Hawking, físico.

ALCÂNTARA, B. K. **Epidemiologia molecular de papilomavírus bovino identificados em sarcoides equinos**. 2013. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Londrina, 2013.

Em equinos os sarcoides são considerados tumores fibroblásticos de pele mais comuns e raramente apresentam regressão espontânea. Os papilomavírus bovino (BPV) tipos 1 e 2 estão envolvidos na etiologia dos sarcoides e, provavelmente, o BPV13 descrito recentemente também pode apresentar participação na etiopatogenia destes tumores. O objetivo do presente estudo foi definir a epidemiologia molecular do BPV em uma coleção de 20 espécimes de sarcoide equino de 15 animais provenientes de quatro regiões do Brasil. No total, foram avaliadas amostras de 20 sarcoides sendo 12 de material fresco e 8 de tecido fixado em formaldeído e embocado em parafina. A presença de tumores fibroblásticos tipo sarcoide foi confirmada em 18/20 as amostras por meio da técnica de histopatologia. A amplificação do DNA de BPV nas amostras de sarcoides incluídas no estudo foi realizada por meio da técnica de PCR utilizando três pares distintos de *primers*. O primeiro par de *primers*, IDFN-2/IDNT-2, que amplifica 102 pb da ORF L1 do PV, foi utilizado para triagem das amostras. O segundo par utilizado amplifica uma sequência comum da ORF E5 e parte da L2 dos BPVs do gênero *Deltapapillomavirus*. O terceiro par foi o FAP59/FAP64, que amplifica 480 pb do gene L1 do PV de diversas espécies animais. Na PCR de triagem foi possível obter *amplicons* nas 20 amostras de sarcoides avaliadas. O produto do tamanho esperado de 250 pb foi obtido em todas as amostras submetidas à PCR utilizando os *primers* E5L2. Entretanto, a PCR realizada com os *primers* FAP produziu *amplicons* somente nas amostras de sarcoides provenientes de material fresco. Após o sequenciamento de nucleotídeos dos produtos amplificados, foi possível realizar duas análises filogenéticas, uma tendo como base o produto amplificado na região E5L2 e outra baseada na sequência obtida com os *primers* FAP. Na análise do fragmento E5L2, nas 20 amostras de sarcoide processadas foi possível identificar os tipos BPV1, 2 e 13 em 14 (70%), 2 (10%) e 4 (20%) amostras, respectivamente. Nos produtos obtidos com os *primers* FAP foi possível identificar os tipos BPV1, 2 e 13 somente nas amostras de sarcoides provenientes de material fresco sendo que os resultados obtidos com os *primers* E5L2 e FAP foram coincidentes. Em dois animais foi possível avaliar mais de uma lesão. Um animal apresentou infecção singular com o BPV1 nas três lesões analisadas. O outro animal, em quatro lesões, foi possível identificar infecção mista com os três tipos de BPVs do gênero *Deltapapillomavirus* (BPV1, 2 e 13). Esse é o primeiro relato da identificação simultânea de três tipos distintos de BPVs, todos do gênero *Deltapapillomavirus*, em lesões de sarcoides provenientes de um mesmo animal. O presente estudo ratificou o envolvimento do BPV1 e 2 na etiologia do sarcoide, e reforça a importância da participação do BPV13 na etiopatogenia deste tumor fibroblástico em equinos.

Palavras-chave: Saúde equina. Tumor equino. Papilomavírus bovino. Epidemiologia. BPV13.

ABSTRACT

ALCANTARA, B. K. **Molecular epidemiology of bovine papillomavirus identified in equine sarcoids.** 2013. 68f. Dissertation (Master's Degree in Science Animal) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

Sarcoids are the most common fibroblastic tumors of equine skin and rarely show spontaneous regression. The bovine papillomavirus (BPV) types 1 and 2 are classically involved in the pathogenesis of sarcoid, and probably the new BPV type (BPV13) described have also a participation in the pathogenesis of sarcoid. The present study attempted to characterize the BPVs DNA in equine sarcoid from 15 horses of four Brazilian regions. In total, 20 samples of cutaneous lesions were processed, 12 of fresh tissue and 8 of formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. The samples were confirmed as sarcoid by routine histopathology. Three primers set were used to identify the BPV DNA by PCR assays. The consensus primer set IFNR-2 and IDNT-2 was used as screening to amplify a 102 bp fragment of the papillomavirus (PV) L1 ORF. The second primer set used is complementary to a common sequence of the E5L2 ORF of BPV1, 2, and 13. The third primer pair used was FAP59 and FAP64, which target sequence is a fragment of approximately 480 bp of L1 ORF of PVs. The screening PCR yielded amplicons in all samples. The amplicons of the expected length, approximately 250 bp, were obtained in 20 DNA samples by the PCR using E5L2 primer set. The FAP PCR yielded amplicons only in fresh samples. After nucleotides sequencing of the amplicons, two phylogenetic analyses were performed, one based on fragment E5L2 and other based on the sequence of L1 obtained with FAP primer. In E5L2 amplicons from 20 sarcoids were identified BPV1, 2, and 13 in 14 (70%), 2 (10%), and 4 (20%) samples, respectively. FAP amplicons allowed identifying BPV1, 2, and 13 only in fresh tissue samples, and the results were similar with E5L2 primers. In two equines with multiple lesions was possible to analyse more than one sarcoid tumor. One animal showed single infection with BPV1 and the other animal presented mixed infection with the three types of bovine *Deltapapillomavirus* (BPV1, 2, and 13). For the first time in a case of mixed infection in sarcoid, the three types of bovine *Deltapapillomavirus* were identified in a single animal. This study confirms the involvement of BPV1 and 2 in the pathogenesis of sarcoid and also showed the importance of BPV13 in the etiopathology of this fibroblastic tumor in equines.

Key words: Equine health. Equine tumor. Bovine papillomavirus. Epidemiology. BPV13.

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

“Characterization of Bovine *Deltapapillomavirus* (BPV1, 2, and 13) DNA in Equine Sarcoids”.

Table 1 – Equine sarcoids lesions evaluated to characterize the DNA BPV 48

Table 2 – Oligonucleotide primers employed for PCR amplification of BPV1, 2, and 13 DNA in sarcoids samples 49

Table 3 – Characterization of the BPVs types identified in DNA samples of sarcoids from Brazilian horses 50

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Microscopia eletrônica do papilomavírus canino tipo 1 (CPV1) em papiloma oral canino apresentando padrão paracristalino. Fonte: Campo, 2002 34
- Figura 2** – Organização genômica do papilomavírus bovino 1 (BPV1), mostrando os genes E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1, L2 e a região longa de controle (LCR) entre a L1 e E6. Fonte: Esquema cedido por: Rodrigo A. A. Otonel, Laboratório de Virologia Animal / DMVP / CCA, Universidade Estadual de Londrina 34
- Figura 3** – Representação esquemática da replicação do papilomavírus humano 16 (HPV16). O epitélio diferenciado está representado esquematicamente no lado esquerdo e os marcadores são expressos representados como setas à direita. Seguindo o acesso à camada basal, o vírus infecta a célula. As proteínas E6 e E7 (núcleos vermelhos) são expressas a partir do promotor precoce, P97 no HPV16, nas camadas inferiores do epitélio (seta vermelha). Os círculos azuis representam núcleos de células não infectadas ou não permissivas, os núcleos vermelhos representam as células infectadas. A expressão do gene E4 e, provavelmente, de outras proteínas (verde) ocorre a partir do promotor P670 no HPV16 (seta verde). A expressão das proteínas do capsídeo (L1 e L2) do vírus é representada pela seta cor laranja. Fonte: Zheng e Baker, 2006 35

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

“Characterization of Bovine *Deltapapillomavirus* (BPV1, 2, and 13) DNA in Equine Sarcoids”.

- Figure 1** – Sarcoid from horse 6 (Distrito Federal), clinically classified as mixed sarcoid (fibroblastic and nodular) with ulcerated regions 51
- Figure 2** – The histopathological features are formed by an extensive proliferating epidermis, which invaded the underlying dermis with several epithelial pegs (arrows) (A). The dermis was formed by extensive sheets of proliferating fibroblasts that demonstrated discrete cellular and nuclear pleomorphism (arrows), with reduced mitotic index (B) 52

Figure 3 – Phylogenetic tree obtained by the maximum-likelihood method based on the nucleotide sequences of a 185 bp region within BPV E5L2 gene. Bootstrap values are indicated when 50% as a percentage was obtained from 1,000 replications. The BPVs strains are color marked, the Eq.Sar.9-BRA (blue diamond) shared 100% of nt with Eq.Sar.13 and 14; the Eq.Sar.1.1-BRA (purple diamond) shared 100% of nt with Eq.Sar.BRA-1.2; 1.3; 2.4; 4; 8; 10 and 15; the Eq.Sar.BRA-6 (yellow diamond) shared 100% of nt with Eq.Sar.BRA-12; the Eq.Sar.BRA-2.2 (red diamond) shared 100% of nt with Eq.Sar.BRA-3; the Eq.Sar.BRA-5 (green diamond) shared 100% of nt with Eq.Sar.BRA-11; the Eq.Sar.2.1 (pink diamond) shared 100% of nt with Eq.Sar.BRA-2.3. OaPV-1 was included as outgroup. BPV sequence names are labeled as follows: BLAST identification and GenBank accession number. The scale bar represents a genetic distance of 0.1 substitutions per site 53

Figure 4 – Phylogenetic tree obtained by the maximum-likelihood method based on the nucleotide sequences of a 341 bp region within BPV L1 gene, 5558 to 6013 nt of BPV1, 5725 to 6199 nt of BPV2 and 5745 to 6219 nt of BPV13. Bootstrap values are indicated when 50% as a percentage was obtained from 1,000 replications. The BPV strains from *Deltapapillomavirus* genera identified in equine sarcoid lesions Eq.Sar.BRA-1.1, Eq.Sar.BRA-2.1 and Eq.Sar.BRA-2.2 are color marked as yellow, blue and green, respectively. BPV sequence names are labeled as follows: BLAST identification and GenBank accession number. The scale bar represents a genetic distance of 0.1 substitutions per site 54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPV	<i>Bovine papillomavirus</i> ou <i>bos taurus papillomavirus</i> (Papilomavírus bovino)
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EcPV	<i>Equus caballus papillomavirus</i> (Papilomavírus equino)
FFPE	<i>formalin fixed paraffin-embedded</i> (fixado em formaldeído e embebido em parafina)
HEB	hematúria enzoótica bovina
HPV	<i>Human papillomavirus</i> (Papilomavírus humano)
ICTV	<i>International Committee on the Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)
LCR	<i>Long Control Region</i> (Região longa de controle)
MHC I	<i>major histocompatibility complex class I</i> (Complexo principal de histocompatibilidade classe I)
MscPV1	<i>Miniopterus schreibersii papillomavirus type 1</i>
ORF	<i>Open reading frame</i> (fase aberta de leitura)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PV	Papilomavírus
PVLPs	<i>Papillomavirus like-particles</i> (partículas semelhantes a papilomavírus)
VLPs	<i>virus like-particles</i> (partículas semelhantes a vírus)

1 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 – EQUINOCULTURA	14
1.2 – SARCOIDE EQUINO	15
1.3 – FAMÍLIA <i>PAPILLOMAVIRIDAE</i>	16
1.4 – PAPILOMAVÍRUS EQUINO (<i>EQUUS CABALLUS PAPILLOMAVIRUS</i> – ECPV).....	20
1.5 – PAPILOMAVÍRUS BOVINO (<i>BOS TAURUS PAPILLOMAVIRUS</i> – BPV).....	21
1.6 – ASSOCIAÇÃO DO BPV COM SARCOIDE EQUINO	22
1.7 – IMUNOPROFILAXIA PARA O BPV	24
1.8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS..	26
REFERÊNCIAS	27
FIGURAS	34
2 OBJETIVOS	36
2.1 – OBJETIVO GERAL.....	36
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS..	36
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	37
Characterization of Bovine <i>Deltapapillomavirus</i> (BPV1, 2, and 13) DNA in Equine Sarcoid	37
Summary	37
1 Introduction	37
2 Materials and Methods	39
2.1 – Cutaneous Lesions	39
2.2 – Histopathology	39
2.3 – DNA Extraction.....	39
2.4 – PCR Assay.....	40
2.5 – Sequences Analysis.....	40
2.6 – Phylogenetic Analysis.....	41
3 Results	41
4 Discussion	42
5 Reference	45

4 CONCLUSÕES	55
APÊNDICE	56
APÊNDICE A – Lista de Reagentes	57
APÊNDICE B – Soluções e Tampões.....	58
APÊNDICE C – Protocolo e Técnicas	59
APÊNDICE D – Lista de Software	64
ANEXO	65
ANEXO A – Figura 1.....	66
ANEXO B – Figura 2.....	67
ANEXO C – Figura 3.....	68

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 – EQUINOCULTURA

A equinocultura é uma atividade que ocupa importante posição na agropecuária e, conseqüentemente, na economia brasileira. O rebanho equino brasileiro é o quarto maior rebanho do mundo, menor apenas do que os rebanhos do México, China e dos Estados Unidos da América (BRASIL, MAPA, 2013). Segundo estudos realizados pela Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (Universidade de São Paulo) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, MAPA, 2013) o agronegócio do cavalo movimenta R\$ 7,5 bilhões por ano, incluindo atividades associadas à equoterapia, esporte, lazer e aquelas associadas à bovinocultura.

O efetivo de equinos referente ao ano de 2011 foi de 5,508 milhões de cabeças, apresentando certa estabilidade em relação ao ano anterior (-0,1%). O plantel brasileiro encontra-se concentrado nas regiões Sudeste (24,4%) e Nordeste (24,3%). Os maiores efetivos encontram-se nos estados de Minas Gerais, Bahia e Rio Grande do Sul, representando, respectivamente, 14,3%, 10,1% e 8,6% do total nacional. Neste período houve aumento no rebanho somente na região Norte (BRASIL, IBGE, 2012).

A expansão da exportação de animais vivos, no Brasil, alcançou 524% entre 1997 e 2009, passando de US\$ 702,8 mil para US\$ 4,4 milhões. Além da exportação de animais vivos, o Brasil também é o nono maior exportador de carne equídea (exportação líquida, ou seja, exportação menos importação) e atingiu, aproximadamente, a movimentação de €\$ 5 milhões por ano. Bélgica, Holanda, Itália, Japão, França e Estados Unidos da América são os principais importadores da carne de cavalo brasileira, além da carne equina, carnes provenientes de asininos e muares são muito apreciadas no mercado chinês (BRASIL, MAPA, 2013).

O impacto determinado pela equinocultura no agronegócio brasileiro aumentou o interesse do governo e da sociedade em geral em incentivar pesquisas relacionadas tanto à produção quanto à sanidade animal. Houve aumento, nos últimos dez anos, no número de artigos publicados relacionados às áreas da medicina, cirurgia (63%), sanidade (25%) e produção de equinos (9,3%) (ALMEIDA; SILVA, 2010).

1.2 – SARCOIDE EQUINO

Os sarcoides são tumores fibroblásticos, geralmente não metastáticos, que aparecem na pele de equinos. Raramente ocorre regressão espontânea e, na maioria dos casos, o tratamento é de difícil resolução (BOGAERT et al., 2008; NASIR; CAMPO, 2008). Segundo Souza et al. (2011) sarcoides e carcinomas de células escamosas são os tumores que mais afetam a pele de equinos no estado do Rio Grande do Sul.

Os dados referentes a epidemiologia do sarcoide não esclarecem se existe predisposição de raça, sexo e idade dos animais acometidos. Apesar da maioria dos trabalhos indicar maior prevalência em machos jovens (NASIR; CAMPO, 2008), um estudo realizado em cavalos na região sul do Brasil mostrou que o sarcoide acomete, principalmente, fêmeas da raça Crioula entre 1 e 5 anos de idade (BRUM et al., 2010).

A literatura aponta que os papilomavírus bovino (*Bovine papillomavirus-BPV*) tipos 1 e 2 são os agentes etiológicos desta enfermidade (LANCASTER et al., 1979; BOGAERT et al., 2007) e, aparentemente, o BPV tipo 13, recentemente descrito em bovinos (LUNARDI et al., 2013a), também pode estar relacionado com a etiopatogenia deste tumor (LUNARDI et al., 2013b *in press*).

O aspecto clínico do sarcoide é bastante variado, podendo ser classificado em oculto, que se caracteriza como áreas de alopecia circulares na pele; verrucoso; fibroblástico, que pode apresentar massa ulcerada; nodulares, que consistem em massas firmes situadas abaixo da pele; e mistos, que mostram uma combinação das características dos sarcoides verrucoso, sarcoides fibroblásticos e nodulares. O sexto tipo de sarcoide é uma forma invasiva com infiltração de vasos linfáticos e é considerada a forma mais maligna (KNOTTENBELT, 2005). No entanto, histopatologicamente é difícil diferenciar as lesões, uma vez que apresentam semelhanças entre si, como hiperqueratose, degeneração das células da camada espinhosa, proliferação do tecido conjuntivo na derme e hiperplasia de células epidérmicas (NASIR; CAMPO, 2008).

Os sarcoides apresentam grande impacto na saúde e bem-estar animal, devido à dificuldade no tratamento e, geralmente, apresentar recidivas após intervenções cirúrgicas (MARTENS et al., 2001). Apesar disto, a epidemiologia e transmissão da doença ainda não estão totalmente esclarecidas, dificultando o delineamento do manejo preventivo e profilático.

O tratamento mais utilizado em casos de sarcoide equino é a excisão cirúrgica, ou criocirurgia, associado à administração de BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), para estimular a resposta imune celular. Mesmo após o tratamento, a incidência de recorrência do tumor é alta (MARTENS et al., 2001). Stadler et al. (2011) propuseram o uso tópico de aciclovir após a remoção cirúrgica do sarcoide, e verificou o regressão do tumor durante um período de dois a seis meses, entretanto nos casos mais graves não houve regressão.

Alguns estudos indicam a possibilidade da imunização contra sarcoide equino utilizando vacinas a partir de *papillomavirus like-particles* (PVLPs), produzidas, principalmente, com o BPV1 (ASHARIF et al., 2008; MATTIL-FRITZ et al., 2008). Entretanto, como a produção de anticorpos neutralizantes nos casos de papilomatose é tipo-específica (NICHOLLS; STANLEY, 2000), é importante esclarecer a relação dos outros tipos de BPVs com a etiopatogenia, assim como a epidemiologia do sarcoide equino.

1.3 – FAMÍLIA *PAPILLOMAVIRIDAE*

Os papilomavírus (PVs) são vírus epiteliotrópicos que induzem lesões hiperproliferativas e infectam grande diversidade de hospedeiros incluindo mamíferos, aves e répteis, ocasionando enfermidades semelhantes nas espécies acometidas denominadas de papilomatoses que estão amplamente distribuídas em todo mundo (ALFIERI et al., 2012).

A infecção do epitélio mucoso pelo papilomavírus está relacionada à formação de tumores malignos. Em seres humanos a infecção do colo do útero pode levar à formação de neoplasia, sendo considerada a segunda neoplasia mais comum em mulheres e a quarta causa de morte em mulheres por câncer no Brasil (ZUR HAUSEN, 1994; MS, BRASIL, 2013). A partir da década de 1970, com o avanço da biologia molecular, os estudos sobre papilomavírus aumentaram e tomaram posição importante na oncologia (ALFIERI et al., 2012).

Um aspecto importante que caracteriza os PVs é a dificuldade de propagação *in vitro*, em culturas de monocamada celular, uma vez que *in vivo* esses vírus se replicam no núcleo das células do epitélio e requerem o aparato de diferenciação celular para a replicação (CAMPO, 2002). Com isso, a caracterização de novos tipos de PVs é realizada por meio de técnicas moleculares que possibilitam a identificação do DNA viral (HOWLEY; LOWY, 2007).

Originalmente, os PVs eram agrupados na família *Papovaviridae*. Entretanto, com o advento das tecnologias moleculares foi possível constatar diferenças na organização genômica entre os vírus desta família, levando o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (*International Committee on the Taxonomy of Viruses- ICTV*) reconhecer oficialmente duas famílias distintas denominadas *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae* (DE VILLERS et al., 2004).

Segundo De Villers et al. (2004), a classificação taxonômica dos PVs é baseada na comparação das sequências de nucleotídeos e nos aspectos biológicos tais como espécie hospedeira, tecido alvo, patogenicidade e organização do genoma. Com estas considerações foi possível determinar a existência de 16 gêneros nesta família, os quais foram nomeados pelas letras gregas de alpha até pi.

Todavia, após esta classificação, a descrição de 13 novos gêneros esgotou o alfabeto grego. Bernard et al. (2010) propuseram continuar com o alfabeto grego, mas acrescentando o prefixo “dyo” nos novos gêneros. Assim, com base na sequência de nucleotídeos do gene L1, atualmente a família *Papillomaviridae* contém 29 gêneros (*Alpha- a Dyoiotapapillomavirus*), agrupando cerca de 224 tipos de PVs, identificados em humanos (149 tipos), outros mamíferos (69 tipos), aves (3 tipos) e répteis (3 tipos) (BERNARD et al., 2010). Além desses novos tipos reconhecidos, um novo gênero de PV denominado *Dyolambdapapillomavirus* foi recentemente sugerido por Tse et al. (2012) para classificar uma nova espécie de PV isolado em morcego denominada de *Miniopterus schreibersii Papillomavirus type 1* (MscPV1).

O gene L1, que codifica a principal proteína do capsídeo e também é a região mais conservada do genoma viral, é o gene mais utilizado na identificação dos PVs. Com base neste critério, PVs que compartilham menos de 60% de identidade na sequência de nucleotídeos do gene L1 são considerados gêneros diferentes; PVs que compartilham entre 60 e 70% de identidade são classificados como diferentes espécies, pertencentes ao mesmo gênero; os tipos de PVs dentro da mesma espécie compartilham de 71 a 89% de identidade da L1. Diferenças de 2 a 10% na sequência de nucleotídeos definem subtipos e menos de 2% definem variantes virais (DE VILLIERS et al., 2004).

Em consenso com a comunidade de pesquisadores de PVs, Bernard et al. (2010) propuseram que a nomenclatura dos PVs animais deveria ser baseada no nome científico do hospedeiro, usando a designação do gênero e espécie. Por exemplo, anteriormente o EqPV era abreviação de *Equine papillomavirus*, com a nova proposta

mudaria para *Equus caballus papillomavirus* (EcPV). O presente trabalho irá referir aos PVs animais segundo a nova proposta sugerida.

Os PVs são vírus oncogênicos, pequenos (52 a 55 nm de diâmetro), não envelopados, com simetria icosaédrica, cujo genoma é constituído por uma molécula de DNA fita dupla circular com extensão próxima de 8 kb (ZHENG; BAKER, 2006). A massa molecular do ácido nucléico é de 5.0×10^6 daltons e representa 12% da massa do vírion. A partícula viral é resistente às condições do meio ambiente e a solventes lipídicos como o éter e clorofórmio (Figura 1) (ALFIERI et al., 2012). Os primeiros papilomavírus que tiveram o genoma completo sequenciado foram o papilomavírus humano tipo 1 (*Human papillomavirus type 1* - HPV1) e o papilomavírus bovino tipo 1 (*Bos taurus papillomavirus type 1* - BPV1) (DANOS et al., 1982; CHEN et al., 1982).

A organização do genoma é semelhante em todos os gêneros descritos de PVs. O genoma é dividido em três regiões principais, uma região inicial (*Early* - E), uma região tardia (*Late* - L) e uma região longa de controle (*Long Control Region* - LCR). A região E ocupa mais de 50% do genoma do vírus e codifica seis fases abertas de leitura (*Open reading frames* - ORF), que são E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que codificam proteínas regulatórias e oncogênicas. Duas outras ORFs, E3 e E8, também foram inicialmente atribuídas a esta região. Entretanto, apenas na ORF E8 do BPV3 e do HPV31 foi comprovada que a codificação de uma proteína, que é “fundida” à proteína E2, cuja função é regular a transcrição viral e a replicação. Entretanto, em PVs de coelhos esta proteína está caracterizada como sendo oncogênica, semelhante à função da E5 (ZHENG; BAKER, 2006).

A região L ocupa cerca de 40% do genoma do vírus e apresenta duas ORFs (L1 e L2) que codificam as proteínas do cápsideo. A região LCR possui um segmento de aproximadamente 850 pb (10% do genoma do HPV), não codifica nenhuma proteína, mas contém a origem da replicação, assim como sítios de ligação de fatores de transcrição múltiplos que são importantes na regulação da transcrição do material gênico (ZHENG; BAKER, 2006). A função das proteínas codificadas pelo PV já está bem caracterizada para o BPV1 e HPV1. A localização das ORFs no genoma do BPV1 está indicada na figura 2.

As proteínas codificadas pelas ORFs E1 e E2 estão envolvidas na regulação da transcrição e na replicação do vírus. A E1 permite o relaxamento das fitas do genoma viral e age como fator de alongação na replicação do DNA, enquanto a E2 aumenta a especificidade e eficiência da ligação da origem da replicação da E1. Os produtos dos genes

E5, E6 e E7 apresentam regulação negativa pelas proteínas E1 e E2. Na ausência de E1 e E2, os produtos de E6 e E7 são oncogenes potentes (CAMPO, 1997).

O gene E5 é o principal gene encontrado em células transformadas. Esse gene sobreposiciona o gene E2 e está relacionado à formação de fibropapilomas. O complexo principal de histocompatibilidade I (*major histocompatibility complex class I* - MHC I) é responsável por apresentar os peptídeos antigênicos às células T, possuindo grande função na imunidade do hospedeiro. A E5 suprime a expressão do MHC I, que pode elucidar a função da E5 no estabelecimento da infecção por BPV4 no canal alimentar e pelo BPV2 na mucosa da bexiga levando à formação de fibropapilomas (CORTEGGIO et al., 2013 *in press*). As proteínas E6 e E7 também possuem atividade oncogênica sendo que a E6 inibe função da proteína p53, que é uma proteína supressora de tumor, e a E7 coopera com a E5 e E6 inibindo a função da proteína inibidora do ciclo celular, da família retinoblastoma, p105Rb (NASIR; CAMPO, 2008).

As proteínas estruturais L1 e L2 possuem função importante na infecção e na imunogenicidade. A proteína maior L1 interage com proteoglicanos de sulfato de heparina da superfície celular e a L2 induz a montagem dos vírions através da ligação ao DNA viral, sendo mais abundante nos papilomas maduros (LOWE et al., 2008; BORZACHIELLO; ROPERTO, 2008). As duas proteínas tem sido empregadas com sucesso no desenvolvimento de vacinas, principalmente em humanos, devido ao fato de apresentarem epítomos que induzem a produção de anticorpos neutralizantes (NASIR; CAMPO, 2008). Rebanhos bovinos vacinados com VLPs (*virus like-particles*) formadas a partir da L1 e L2 do BPV4 exibiram alto título de anticorpos neutralizantes em relação ao grupo controle não vacinados (JAGU et al., 2011). Em coelhos e cães a transferência passiva destes anticorpos neutralizantes já foi demonstrada, entretanto, o título mínimo necessário para a proteção eficaz ainda não é conhecido (NICHOLLS; STANLEY, 2000). Os PVs animais, principalmente o papilomavírus canino tipo 1 (*Canis familiaris papillomavirus* – CPV1), são modelos para estudo da papilomatose em humanos (SUZICH et al., 1995) e, por isto, é necessário maior conhecimento da estrutura e da organização do genoma de novos PVs identificados.

O ciclo replicativo do BPV está intimamente ligado ao processo de diferenciação do tecido epitelial do hospedeiro. Inicialmente, o vírus infecta queratinócitos basais. Após a ligação e entrada do vírus na célula, os vírions migram para o núcleo, onde ocorrerá replicação do DNA viral durante a fase S do ciclo celular iniciada pelas proteínas E1

e E2. A capacidade das células diferenciadas em manter a progressão do ciclo celular é mediada, principalmente, pela ação da proteína viral E7. A amplificação do genoma viral é dependente da diferenciação em células suprabasais e coincide com a ativação dos promotores virais tardios, ou seja, as etapas da replicação ocorrem de acordo com a fase de diferenciação. As transcrições tardias codificam as proteínas virais do capsídeo (L1 e L2). A progênie viral é montada em células altamente diferenciadas e, em seguida, liberada para o meio extracelular durante a descamação do epitélio (Figura 3) (LEE; LAIMINS, 2007).

A literatura tem demonstrado que vários tipos de HPV podem estar presentes na pele saudável de seres humanos, na forma de agentes comensais (FOURSLUND et al., 1999; ANTONSSON et al., 2000). O mesmo ocorre com o BPV, tanto em bovinos quanto em equinos, onde o BPV também tem sido isolado em pele saudável (OGAWA et al., 2004; ANTONSSON, MC MILLAN, 2006; BOGAERT et al., 2008).

O DNA do PV persiste nas células tumorais na forma epissomal ou integrada no genoma da célula hospedeira (KLIMOV et al. 2002). O DNA viral está presente exclusivamente na forma epissomal em papilomas benignos. Entretanto na maioria dos cânceres cervicais malignos em humanos o DNA viral está integrado no genoma da célula hospedeira (CULLEN et al. 1991).

1.4 – PAPILOMAVÍRUS EQUINO (*EQUUS CABALLUS PAPILOMAVIRUS* – ECPV)

A papilomatose equina é uma enfermidade dermatológica não muito comum. Atualmente, a infecção está associada ao papilomavírus equino tipos 1, 2, 3 e 4 (*Equus caballus papillomavirus type 1, 2, 3 e 4* - EcPV1, EcPV2, EcPV3 e EcPV4). Os papilomas clássicos equinos são normalmente encontrados em cavalos jovens. Eles ocorrem, principalmente, no focinho ou lábios, mas também podem ocorrer em outros locais. A etiologia dos papilomas equinos foi associada, inicialmente, ao EcPV1 (GHIM et al., 2004; POSTEY et al., 2006). Papilomas genitais em cavalos de ambos os sexos também foram associados ao PV e estas lesões geralmente apresentam característica autolimitante, porém já foi relatado um caso de papiloma que progrediu para carcinoma em um cavalo (SMITH et al., 2009). Os papilomas no pavilhão auditivo de equinos, também conhecidos como placa aural, têm sido descritos em cavalos de todas as idades e, provavelmente, estariam associados ao EcPV3 e EcPV4 (LANGE et al., 2011; TANIWAKI et al., 2013).

Atualmente, estudos baseados no alinhamento da ORF L1 identificaram quatro tipos de EcPV, que foram separados em gêneros diferentes, *Zeta-PV* no caso do EcPV1 e *Dyoiota-PV* que agrupa os EcPV2 e 4, enquanto o EcPV3 permanece ainda não classificado. Entretanto, mais detalhes sobre a epidemiologia e os mecanismos moleculares destes novos PVs serão necessários para esclarecer a associação destes com as neoplasias epiteliais (LANGE et al., 2011).

1.5 – PAPILOMAVÍRUS BOVINO (*BOS TAURUS PAPILOMAVIRUS* – BPV)

Atualmente, existem 13 tipos de BPV identificados e caracterizados em bovinos. Os BPVs estão agrupados nos gêneros *Deltapapillomavirus* (BPV1, 2 e 13), *Xipapillomavirus* (BPV3, 4, 6, 9, 10, 11, e 12) e *Epsilonpapillomavirus* (BPV5 e 8). O BPV7 ainda não foi classificado em nenhum gênero (BERNARD et al., 2010; LUNARDI et al., 2013a). Além dos BPVs já caracterizados, análises de fragmentos parciais do gene L1 têm permitido a descrição de prováveis novos tipos de BPVs, que aguardam a caracterização genômica completa para a definição taxonômica (OGAWA et al., 2004; CLAUS et al., 2008; OGAWA et al., 2007; TOMITA et al., 2007; NASIR; CAMPO, 2008).

A infecção por *Delta-PVs* leva à transformação de fibroblastos subepiteliais, seguida por acantose e papilomatose; por *Xi-PVs* induz a transformação somente do epitélio; enquanto que a infecção por *Epsilon-PVs* podem induzir transformação tanto dos fibroblastos quanto de células epiteliais. Papilomas e fibropapilomas podem ocorrer em diferentes sítios anatômicos dos bovinos, onde diferentes genótipos de BPV podem ser isolados. Os BPVs também podem ser encontrados em linfócitos de sangue periférico, no entanto, não existe evidência da replicação viral nessas células. Essa observação é importante pela implicação na patogênese da infecção, pois sugere que a corrente sanguínea pode carrear o vírus para diferentes tecidos (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008). Os recentes BPVs descritos também estão associados à formação de papilomas cutâneos (BPV11, 12) (HATAMA et al., 2011; ZHU et al., 2012) e fibropapilomas (BPV13) (LUNARDI et al., 2013a).

Os achados histológicos dos papilomas são caracterizados pela presença de vesículas intracitoplasmáticas em células do estrato espinhoso, pelo aumento na quantidade de granulações basofílicas, intracitoplasmáticas e intranucleares no estrato granuloso; e por inclusões eosinofílicas intranucleares em queratinócitos. Além da papilomatose cutânea, o BPV também está relacionado com duas enfermidades importantes na produção bovina, a

hematúria enzoótica bovina (HEB) e o tumor de trato digestório superior (CAMPO et al., 1992). Evidências epidemiológicas demonstram que algumas lesões benignas podem sofrer transformação maligna em resposta a fatores genéticos ou ambientais (HOPKINS, 1986).

Estudos demonstraram que a presença do BPV1 e 2, associada à ação dos compostos carcinogênicos da samambaia (*Pteridium aquinilum*), leva à progressão maligna das lesões na mucosa vesical responsáveis pelos quadros clínicos observados na HEB (WOSIACKI et al., 2002; BORZACCHIELO; ROPERTO, 2008). A literatura mostra que o mesmo princípio carcinogênico que induz a formação de papilomas no trato urinário também ocorre na formação de tumores do trato gastrointestinal superior associado à infecção pelo BPV4 (MORRIS et al., 2010).

A transmissão do BPV2 e BPV4 ainda não está totalmente esclarecida (WOSIACKI et al., 2002; MORRIS et al., 2010). Entretanto, a evidência da presença do BPV2 em placenta de vacas com HEB sugere a possibilidade de transmissão vertical do vírus, uma vez que em humanos já foi comprovado que bebês de mães HPV positivas tem alto risco de infecção (ROPERTO et al., 2012). Além disso, a identificação do DNA do BPV em amostras de urina, sêmen, espermatozoides, leite, sangue e linfócitos sugere que a eliminação do vírus não está restrita ao epitélio infectado (DINIZ et al., 2009; LINDSEY et al., 2009).

1.6 – ASSOCIAÇÃO DO BPV COM SARCOIDE EQUINO

Os PVs são altamente espécie-específicos, entretanto há relatos de infecção heteróloga pelos BPV1 e 2 em equinos, resultando na formação dos sarcoides, que é o tumor de pele mais comum em equinos, mais frequente até mesmo que a papilomatose cutânea causada pelos EcPVs (NASIR; CAMPO, 2008). Além de equinos, a infecção heteróloga pelo BPV pode ocorrer em outros animais causando fibropapilomas, como em búfalos (SILVESTRE et al., 2009; PANGTY et al., 2010), girafas (VAN DYK et al., 2011), antas (KIDNEY; BERROCAL, 2008) e zebras (VAN DYK et al., 2009).

A suspeita da associação do BPV em relação ao sarcoide é antiga, desde quando Olson e Cook (1951) demonstraram a formação de sarcoide em cavalos, aparentemente saudáveis, após a inoculação intradérmica de extratos livres de células produzidos a partir de verrugas de bovinos. Atualmente a identificação do DNA do BPV e a demonstração da expressão dos genes do BPV em sarcoides confirmam o envolvimento deste vírus na etiopatogenia deste tumor (NASIR; CAMPO, 2008).

O BPV1 é frequentemente identificado em sarcoides equinos em várias regiões do mundo como na Europa (ANGELOS 1991; TEIFKE et al., 1991; OTTEN et al., 1993); no oeste do Canadá, o BPV2 é mais prevalente que o BPV1 (WOBESER et al., 2010); e no oeste dos Estados Unidos da América, o BPV1 e 2 são identificados na mesma proporção (CARR et al., 2001).

Além da associação do BPV1 e 2 na etiopatogenia do sarcoide, o novo BPV descrito, BPV13, do gênero *Delta-PV*, também tem sido relacionado com este tumor. O BPV13 era denominado BPV/BR-UEL4, quando somente apresentava a sequência parcial do gene L1. Recentemente, Silva et al. (2010) identificaram o DNA do BPV/BR-UEL4 em um sarcoide de um cavalo do Rio de Janeiro. Lunardi et al. (2013b, *in press*) confirmaram a associação do novo BPV com sarcoides, por meio da identificação do DNA viral em seis amostras de sarcoide equino. Este novo BPV foi descrito inicialmente em bovinos da mesma região geográfica dos cavalos com sarcoide (CLAUS et al., 2008; LUNARDI et al., 2013a).

A literatura demonstra a presença do DNA do BPV em 100% dos sarcoides examinados (OTTEN et al., 1993; CARR et al., 2001; BOGAERT et al., 2008; WOBESER et al., 2010). Os BPVs podem aparecer como infecção latente e o genoma pode ser identificado no epitélio de bovinos e equinos sem sinal clínico de lesão. O epitélio normal aceita a infecção latente e a indução da expressão dos genes virais ocorre quando há danos no epitélio. Possivelmente, este fenômeno está associado à produção de citocinas inflamatórias e estimulação da proliferação celular, consequentemente levando à formação do papiloma (JARRET et al., 1985). Acredita-se que o mesmo processo ocorra para o desenvolvimento dos sarcoides (WOBESER et al., 2012).

Apesar da presença do DNA viral na forma episomal, a infecção por BPV1 e 2 em sarcoides não produz vírions (infecção abortiva) (TEIFKE et al., 1994). Estudos envolvendo a inoculação de macerados de sarcoides em bovinos não induziram a formação de verrugas nos animais inoculados, reforçando a teoria de infecção abortiva (NASIR; CAMPO, 2008).

Brandt et al. (2011) mostraram que a infecção pelo BPV em sarcoides envolve, além dos fibroblastos, também a epiderme e sugeriram que a infecção poderia ser produtiva. Entretanto, Wilson et al. (2013) demonstraram que apesar da marcação das proteínas do capsídeo L1 e L2 por imunohistoquímica, a quantificação por PCR em tempo real do RNAm destas proteínas mostrou baixo número de cópias, confirmando que a infecção do BPV em equinos é não produtiva. Os genes que expressam as principais oncoproteínas são

traduzidos normalmente, como a E2, que apresentou alto número de cópias de RNAm. Além disso, Marchetti et al. (2009) mostraram que, assim como ocorre em bovinos, a proteína E5 possui função importante na indução da formação do sarcoide, inibindo a função do MHC I, levando à deficiência na depuração imunológica das células tumorais.

Strazzullo et al. (2012) mostraram uma evidência adicional na função do gene supressor de tumor FHIT (*fragile histidine triad gene*) em sarcoides equinos e relacionaram com uma possível regulação epigenética nesta neoplasia, sugerindo que também no cavalo, assim como ocorre nos seres humanos, é possível o envolvimento do gene FHIT na formação do sarcoide. A metilação do DNA não parece estar envolvida na alteração de expressão de genes. Entretanto estudos adicionais são necessários para entender os mecanismos moleculares básicos envolvidos na redução da expressão do FHIT.

As fortes evidências da infecção abortiva em sarcoides indica que a principal fonte de infecção do vírus são bovinos com papilomatose. A transmissão ocorreria pelo contato direto entre animais ou fômites, entretanto a transmissão ainda não está totalmente esclarecida, principalmente pelos relatos de sarcoide em animais que nunca tiveram contato com bovino. Este aspecto levou a suspeita da existência de possíveis vetores mecânicos. Nasir e Campo (2008) comentam que a presença do DNA do BPV1 e 2 em moscas (*Musca autumnalis*) sugere que estes insetos possam atuar como vetores do vírus.

Além da associação do BPV com sarcoide equino, Kainzbauer et al. (2012) identificaram pela primeira vez o DNA do BPV1 e EcPV2 em uma amostra de carcinoma de células escamosas (*squamous cell carcinoma-SCC*) e também em linfócitos de sangue periférico de um pônei, e sugeriram a possibilidade de co-infecção na formação de SCC.

1.7 – IMUNOPROFILAXIA PARA BPV

A imunidade para as infecções pelo PV é considerada tipo-específica, e a definição da resolução clínica depende do *status* imunológico dos animais infectados. Enquanto a resposta imune humoral é responsável pela prevenção de novas infecções, a resposta imune celular, envolvendo linfócitos T, é responsável pela regressão espontânea das lesões já estabelecidas. As lesões benignas, produzidas na infecção cutânea e mucosa pelo PV, apresentam tendência de regressão espontânea. No entanto, algumas infecções com curso clínico prolongado e que determinam lesões extensas podem, ocasionalmente, tornarem-se

malignas. Os casos de papilomatose persistente geralmente são observados em animais imunodeprimidos (NICHOLLS; STANLEY, 2000).

O ciclo replicativo viral é restrito ao epitélio e, portanto, o vírus não entra em contato com o sistema imunológico, levando à falha do reconhecimento da infecção pelo sistema imune. A resposta humoral pode ser obtida após a inoculação intramuscular de vírus purificado ou de proteínas virais, uma vez que os antígenos virais entram em contato com as células do sistema imunológico, podendo ser observadas respostas dos linfócitos T e B frente às proteínas do capsídeo (L1 e L2) ou às proteínas transformantes (E7) em estágios finais da infecção, que parecem estar associadas com a rejeição do papiloma (NASIR; CAMPO, 2008).

A expressão dos genes L1 e L2 em células eucarióticas resulta na auto-montagem (empacotamento) de proteínas em partículas semelhantes ao vírus (*virus-like particles* - VLPs), as quais são estruturalmente e antigenicamente similares aos vírions naturais (LOWE et al., 2008). O aproveitamento desta propriedade biológica das proteínas estruturais dos PVs vem sendo empregado com sucesso na elaboração de diversas vacinas profiláticas para diferentes espécies hospedeiras, sendo que VLPs produzidas a partir destes genes tem se mostrado altamente imunogênicas, conferindo proteção após o desafio com o tipo viral específico (JAGU et al., 2011).

Em humanos já é comprovado que títulos elevados de anticorpos neutralizantes podem ser gerados após a imunização com VLPs produzidas a partir da L1 do HPV (BISHOP et al., 2007). Além disso, estudos demonstraram que a vacina elaborada com a proteína L1 do BPV2 promoveu proteção contra a infecção e que o uso da proteína L2 induziu mais rapidamente a regressão de lesões pré-formadas (JARRETT et al., 1991).

Vacinas terapêuticas, desenvolvidas para induzir a regressão das lesões pré-malignas, têm sido desenvolvidas com base na proteína L2 do BPV2, ou na proteína E7 do BPV4. Nestes casos, a regressão ocorre após infiltração de linfócitos e macrófagos, indicando uma resposta imune mediada por células, semelhante ao observado na regressão natural dos papilomas (NASIR; CAMPO, 2008).

Nos casos de sarcoide equino, pouco se sabe sobre os aspectos imunológicos envolvidos na resposta do hospedeiro em relação ao BPV. Considerando que os genes virais são expressos em sarcoides, supõe-se que a vacinação de animais contra as proteínas virais expressas levaria a indução de resposta imune contra os antígenos e uma possível regressão do tumor. Estudos demonstram tendência para regressão do tumor após a inoculação de partículas quiméricas semelhantes a vírus (*chimeric virus like-particles-*

CVLPs) formadas a partir das proteínas L1 e E7 do BPV1 (MATTIL-FRITZ et al., 2008; ASHARIF et al., 2008).

1.8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal impedimento para a caracterização de novos PVs é a ausência de um sistema convencional de cultivo celular para a propagação viral *in vitro*. Os métodos para a identificação de novos PVs são baseados em reações de PCR empregando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) genéricos, também chamados degenerados. Estes *primers*, desenhados a partir de sequências conservadas do gene que codifica a proteína L1 de tipos de PVs anteriormente caracterizados, tem permitido a caracterização de novos tipos de PVs em diversas espécies de hospedeiros (RECTOR et al., 2005).

Uma destas metodologias, envolvendo a utilização do par de *primers* FAP (FAP59 e FAP64), foi originalmente desenvolvida para a amplificação de HPVs cutâneos. Essa estratégia tem sido utilizada com sucesso na detecção de amplo espectro de tipos virais já conhecidos e de novos tipos de HPV, uma vez que a ORF L1 é a mais conservada no genoma dos PVs. Além disso, essa estratégia tem também possibilitado a detecção de novos tipos virais tanto em bovinos quanto em outras espécies animais (FORSLUND et al., 1999; ANTONSSON; HANSSON, 2002; OGAWA et al., 2004; ANTOSSON; MCMILLAN, 2006; LITERÁK et al., 2006; CLAUS et al., 2008).

O agrupamento do BPV13 no gênero *Deltapapillomavirus*, que agrupa os PVs capazes de induzirem fibropapilloma em artiodáctilos, suporta a hipótese de que este novo tipo também pode induzir fibropapilomas em seu hospedeiro natural (LUNARDI et al., 2013a). A hipótese que este novo tipo de BPV estaria relacionado à etiopatogenia do sarcoide foi sugerida quando este novo vírus foi identificado em seis amostras de sarcoides em dois equinos provenientes da região sul do Brasil (LUNARDI et al., 2013 *in press*).

A dificuldade no tratamento, a falta de informação sobre a epidemiologia da doença, a falta de estudos que esclareçam a resposta imunológica do hospedeiro diante do BPV e a identificação de um novo tipo de BPV relacionado ao sarcoide equino tornam a presença deste tumor um grande desafio sanitário para equinocultura brasileira e mundial.

REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A. A.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F. Papillomavirus. In: FLORES, F. E. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: UFSM, 2012. p. 463-480.
- ALMEIDA, F. Q.; SILVA, V. P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 119-129, 2010.
- ANGELOS, J. A.; MARTI, E.; LAZARY, S.; CARMICHAEL, L. E. Characterisation of BPV-like DNA in equine sarcoids. **Archives of Virology**, v. 119, p. 95-109, 1991.
- 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. 12537-12542, 2002.
- ANTONSSON, A.; MCMILLAN, N. A. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3195-3200, 2006.
- ASHRAFI, G. H.; PIUKO, K.; BURDEN, F.; YUAN, Z.; GAULT, E. A.; MÜLLER, M.; TRAWFORD, A.; REID, S. W. J.; NASIR, L.; CAMPO, M. S. Vaccination of sarcoid-bearing donkeys with chimeric virus-like particles of bovine papillomavirus type 1. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 148-157, 2008.
- BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K.; HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E. M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, p. 70-79, 2010.
- BISHOP, B.; DASGUPTA, J.; KLEIN, M.; GARCEA, R. L.; CHRISTENSEN, N. D.; ZHAO, R.; CHEN, X. S. Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 31803-31811, 2007.
- BOGAERT, L.; MARTENS, A.; VAN POUCKE, M.; DUCATELLE, R.; DE COCK, H.; DEWULF, J.; DE BAERE, C.; PEELMAN, L.; GASTHUSYSL, F. High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin of equine sarcoid-affected and healthy horses. **Veterinary Microbiology**, v. 129, p. 58-68, 2008.
- BOGAERT, L.; VAN POUCKE, M.; DUCATELLE, R.; DEWULF, J.; PEELMAN, L.; MARTENS, A.; BAERE, C.; GASTHUYS, F. Bovine papillomavirus load and mRNA expression, cell proliferation and p53 expression in four clinical types of equine sarcoid. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 2155-2216, 2007.
- BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research**, v. 39, n. 5, p. 45-64, 2008.

BRANDT, S.; TOBER, R.; CORTEGGIO, A.; BURGER, S.; SABITZER, S.; WALTER, I.; KAINZBAUER, C.; STEINBORN, R.; NASIR, L.; BORZACCIELLO, G. BPV-1 infection is not confined to the dermis but also involves the epidermis of equine sarcoids. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.35-40, 2011.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

_____. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Instituto Brasileiro de Geografia e estatística - IBGE, v. 39, p. 23-24, 2012.

_____. Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/sobre/saude/saude-da-mulher/cancer>>. Acesso em: 10 jan. 2013.

BRUM, J. S.; SOUZA, T. M.; BARROS, C. S. L. Epidemiological aspects and anatomic distribution of equine sarcoid in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: 40 cases. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 839-843, 2010.

CAMPO, M. S.; JARRET, W. F. H.; BARRON, R.; O'NEILL, B. W.; SMITH, K. T. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Research**, v. 52, n. 24, p. 6898-6904, 1992.

CAMPO, M. S. Bovine papillomavirus and cancer. **Veterinary journal**, v. 154, p. 175-188, 1997.

CAMPO, M. S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. **Virus Research**, v. 89, p. 249-261, 2002.

CARR, E. A.; THEON, A. P.; MADEWELL, B. R.; GRIFFEY, S. M.; HITCHCOCK, M. E. Bovine papillomavirus DNA in neoplastic and non-neoplastic tissues obtained from horses with and without sarcoids in the western United States. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 741-744, 2001.

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

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

CORTEGGIO, A.; ALTAMURA, G.; ROPERTO, F.; BORZACCHIELLO, G. Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one? **Infectious Agents Cancer**, (Epub ahead of print) 2013.

CULLEN, A. P.; REID, R.; CAMPION, M.; LÖRINCZ, A. T. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. **Journal of Virology**, v. 65, p. 606-612, 1991.

DANOS, O.; KATINKA, M.; YANIV, M. Human papillomavirus 1 a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among Papovaviridae. **The European Molecular Biology Organization journal**, v. 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. 324, p. 17-27, 2004.

DINIZ, N.; MELO, T. C.; SANTOS, J. F.; MORI, E.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; FREITAS, A. C.; BEÇAK, W.; CARVALHO, R. F.; STOCCO, R. C. Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 1474-1480, 2009.

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.

GHIM, S. J.; RECTOR, A.; DELIUSC, H.; SUNDBERGD, J. P.; JENSONA, A. B.; RANST, M. V. Equine papillomavirus type 1: complete nucleotide sequence and characterization of recombinant virus-like particles composed of the EcPV-1 L1 major capsid protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 324, p. 1108-1115, 2004.

HATAMA, S.; ISHIHARA, R.; UEDA, Y.; KANNO, T.; UCHIDA, I. Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. **Archives of Virology**, v. 156, p. 1281-1285, 2011.

HOPKINS, N. C. G. Aetiology of enzootic haematuria. **The Veterinary Record**, v. 118, n. 26, p. 715-717, 1986.

HOWLEY, P. M.; LOWY, D. R. Papillomaviruses and their replication. In: **Fields Virology**, 4. ed., p. 2197-2229, 2001.

JAGU, S.; MALANDRO, N.; KWAK, K.; YUAN, H.; SCHLEGEL, R.; PALMER, K. E.; HUH, W. K.; CAMPO, M. S.; RODEN, R. B. S. A multimeric L2 vaccine for prevention of animal papillomavirus infections. **Virology**, v. 420, p. 43-50, 2011.

JARRETT, W. F. H. The natural history of bovine papillomavirus infections. **Advances in Viral Oncology**, v. 5, p. 83-102, 1985.

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.

TANIWAKI, S. A. et al. Phylogenetic and structural studies of a novel equine papillomavirus identified from aural plaques. **Veterinary microbiology**, v. 162, p. 85-93, 2013.

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

- KLIMOV, E.; VINOKOUROVA, S.; MOISJAK, E.; RAKHMANALIEV, E.; KOBSEVA, V.; LAIMINS, L.; KISSELJOV, F.; SULIMOVA, G. Human papilloma viruses and cervical tumours: mapping of integration sites and analysis of adjacent cellular sequences. **Cancer**, v. 2, p. 24, 2002.
- KNOTTENBELT, D. C. A suggested clinical classification for the equine sarcoid. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 4, p. 278–295, 2005.
- LANCASTER, W. D.; THEILLEN, G. H.; OLSON, C. Hybridisation of bovine papillomavirus type 1 and type 2 DNA to DNA from virus-induced hamster tumours and naturally occurring equine tumours. **Intervirology**, v. 11, p. 227-33, 1979.
- LANGE, C. E.; TOBLER, K.; ACKERMANN, M.; FAVROT, C. Identification of two novel equine papillomavirus sequences suggests three genera in one cluster. **Veterinary Microbiology**, v. 149, p. 85-90, 2011.
- LEE, C.; LAIMINS, L. A. The life cycle of human papillomaviruses in keratinocytes. In: GARCEA, L. R. **The Papillomavirus**. Nova York: Springer Science, 2007. p. 45-67.
- LINDSEY, C. L.; ALMEIDA, M. E.; VICARI, C. F.; CARVALHO, C.; YAGUIU, A.; FREITAS, A. C.; BEÇAK, W.; SANTOS, R. C. S. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 310-318, 2009.
- LITERÁK, I.; TOMITA, Y.; OGAWA, T.; SHIRASAWA, H.; SMÍD, B.; NOVOTNÝ, L.; ADAMEC, M. Papillomatosis in a European bison. **Journal of Wildlife Disease**, v. 42, p. 149-153, 2006.
- LOWE, J.; PANDA, D.; ROSE, S.; JENSEN, T. Y.; HUGHESI, W. A.; TSO, F. Y.; ANGELETTI, P. C. Evolutionary and structural analyses of alpha-papillomavirus capsid proteins yields novel insights into L2 structure and interaction with L1. **Virology Journal**, v. 5, 2008, open access, doi: 10.1186/1743-422X-5-150.
- LUNARDI, M.; ALFIERI, A. A.; OTONEL, R. A. A.; ALCÂNTARA, B. K.; RODRIGUES, W. B.; MIRANDA, A. B.; ALFIERI, A. F. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. **Veterinary Microbiology**, v. 162(1):207-213, 2013a.
- LUNARDI, M.; ALCÂNTARA, B. K.; OTONEL, R. A. A.; RODRIGUES, W. B.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Bovine papillomavirus type 13 in equine sarcoids. **Journal of Clinical Microbiology**. Epub ahead of print, 2013b.
- MARCHETTI, B.; GAULT, E. A.; CORTESE, M. S.; YUAN, Z. Q.; ELLIS, S. A.; NASIR, L.; CAMPO, M. S. Bovine papillomavirus type 1 oncoprotein E5 inhibits equine MHC class I and interacts with equine MHC I heavy chain. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 2865-2870, 2009.
- MARTENS, A.; DE MOOR, A.; VLAMINCK, L.; PILLE, F.; STEENHAUT, M. Evaluation of excision, cryosurgery and local BCG vaccination for the treatment of equine sarcoids. **Veterinary Record**, v. 149, p. 665-669, 2001.

- MATTIL-FRITZ, S.; SCHARNER, D.; PIUKO, K.; THÖNES, N.; GISSMANN, L.; MÜLLER, H.; MÜLLER, M. Immunotherapy of equine sarcoid: dose-escalation trial for the use of chimeric papillomavirus-like particles. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 138-147, 2008.
- MORRIS, W. E.; VENZANO, A. J.; CRAIG, M. I.; DIODATI, J. A.; FUNES, D.; ELIZONDO, A.; MERCADO, E.; CAPELLINO, F.; DELGADO, F.; BLANCO-VIERA, J. Upper alimentary tract papillomas in calves related to papillomavirus infection. **Canadian Veterinary Journal**, v. 51, p. 877-880, 2010.
- NASIR, L.; CAMPO, M. S. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. **Veterinary Dermatology**, v. 19, p. 243-254, 2008.
- NICHOLLS, P. K.; STANLEY, M. A. The immunology of animal papilloma-viruses. **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 73, p. 101-127., 2000.
- OGAWA, T.; TOMITA, Y.; OKADA, M.; SHINOZAKI, H. K.; KAIHO, I.; SHIRASAWA, H. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and health teat skin. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2191-2197, 2004.
- OGAWA, T.; OKADA, M.; SHIRASAWA, H. Complete genomic and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1934-1938, 2007.
- OLSON, C.; COOK, H. R. Cutaneous sarcoma-like lesions of the horse caused by the agent of bovine papilloma. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 77, p. 281-284, 1951.
- OTTEN, N.; VON TSCHARNER, C.; LAZARY, S.; ANTCZAK, D. F.; GERBER, H. DNA of bovine papillomavirus type 1 and type 2 in equine sarcoids – PCR detection and direct sequencing. **Archives of Virology**, v. 132, p. 121-131, 1993.
- PANGTY, K.; SINGH, S.; GOSWAMI, R.; SAIKUMAR, G.; SOMVANSI, R. Detection of BPV-1 and -2 and quantification of BPV-1 by real-time PCR in cutaneous warts in cattle and buffaloes. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 185-196, 2010.
- POSTEY, R. C.; APPELYARD, G. D.; KIDNEY, B. A. Evaluation of equine papillomas, aural plaques, and sarcoids for the presence of *Equine papillomavirus* DNA and *Papillomavirus* antigen. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 28-33, 2006.
- 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 the raccoon (*Procyon lotor*) papillomavirus type 1 by using degenerate papillomavirus-specific primers. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 2029-2033, 2005.
- ROPERTO, S.; BORZACHIELLO, G.; ESPOSITO, I.; RICCARDI, M.; URRARO, C.; LUCA, R.; CORTEGGIO, A.; TATE, R.; CERMOLA, M.; PACIELLO, O.; ROPERTO, F. Productive Infection of Bovine Papillomavirus Type 2 in the Placenta of Pregnant Cows Affected with Urinary Bladder Tumors. **PLoS One**, v. 7, open access, 2012, doi:10.1371/journal.pone.0033569.

- SILVA, M. S.; WEISS, M.; BRUM, M. C.; ANJOS, B. L.; TORRES, F. D.; WEIBLEN, R.; FLORES, E. F. Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 603-606, 2010.
- SILVESTRE, O.; BORZACCHIELLO, G.; NAVA, D.; IOVANE, G.; RUSSO, V.; VECCHIO, D.; D'AUSILIO, F.; GAULT, E. A.; CAMPO, M. S.; PACIELLO, O. Bovine Papillomavirus Type 1 DNA and E5 oncoprotein expression in water buffalo fibropapillomas. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 636, 2009.
- SMITH, M. A.; LEVINE, D. G.; GETMAN, L. M.; PARENTE, E. J.; ENGILES, J. B. Vulvar squamous cell carcinoma in situ within viral papillomas in an aged Quarter Horse mare. **Equine Veterinary Education**, v. 21, p. 11-16, 2009.
- SOUZA, T. M.; BRUM, J. S.; FIGHERA, R. A.; BRASS, K. E.; BARROS, C. S. L. Prevalência dos tumores cutâneos de equinos diagnosticados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 379-382, 2011.
- STADLER, S.; KAINZBAUER, C.; HARALAMBUS, R.; BREHM, W.; HAINISCH, E.; BRANDT, S. Successful treatment of equine sarcoids by topical aciclovir application. **Veterinary Record**, v. 168, p. 187, 2011.
- STRAZZULLO, M.; CORTEGGIO, A.; ALTAMURA, G.; FRANCIOSO, R.; ROPERTO, F.; D'ESPOSITO, M.; BORZACCHIELLO, G. Molecular and epigenetic analysis of the fragile histidine triad tumour suppressor gene in equine sarcoids. **Veterinary Research**, v. 8, 2012, open access, doi:10.1186/1746-6148-8-30.
- SUZICH, J. A.; GHIM, S.; PALMER-HILL, F. J.; WHITE, W. I.; TAMURA, J. K.; BELL, J. A.; NEWSOME, J. A.; JENSON, A. B.; SCHLEGEL, R. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 11553-11557, 1995.
- TANIWAKI, S. A. et al. Phylogenetic and structural studies of a novel equine papillomavirus identified from aural plaques. **Veterinary microbiology**, v. 162, p. 85-93, 2013.
- TEIFKE, J.P.; WEISS, E. Detection of bovine papillomavirus DNA in equine sarcoids using the polymerase chain reaction (PCR). **Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift**, v.104, p.185-295, 1991.
- TEIFK, J. P.; HARDT, M.; WEISS, E. Detection of bovine papillomavirus DNA in formalin-fixed and paraffin-embedded equine sarcoids by polymerase chain reaction and non radioactive in situ hybridization. **Europe Journal of Veterinary Pathology**, v. 1, p. 5-10, 1994.
- TOMITA, Y.; LITERÁK, I.; OGAWA, T.; JIN, Z.; SHIRASAWA, H. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and variant type from European bison. **Virus Genes**, v. 35, p. 243-249, 2007.

TSE, H.; TSANG., A. K. L.; TSOI, H. W.; LEUNG, A. S. P.; HO, C. C.; LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y.; YUEN, K. Y. Identification of a Novel Bat Papillomavirus by Metagenomics. **PLoS One**, v. 7, 2012, open access, doi:10.1371/journal.pone.0043986.

VAN DYK, E.; BOSMAN, A. M.; VANWILPE, E.; WILLIAMS, J. H.; BENGIS, R. G.; VANHEERDEN, J.; VENTER, E. H. Detection and characterisation of papillomavirus in skin lesions of giraffe and sable antelope in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 82, p. 80-85, 2011.

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

WILSON, A. D.; ARMSTRONG, E. L. R.; GOFTON, R. G.; MASON, J.; DE TOIT, N.; DAY, M. J. Characterisation of early and late bovine papillomavirus protein expression in equine sarcoids. **Veterinary Microbiology**, v. 62, p. 369-380, 2013.

WOBESER, B. K.; DAVIES, J. L.; HILL, J. E.; JACKSON, M. L.; KIDNEY, B. A.; MAYER, M. N.; TOWNSEND, H. G. G.; ALLEN, A. L. Epidemiology of equine sarcoids in horses in western Canada. **Canadian Veterinary Journal**, v. 51, p. 1103-1108, 2010.

WOBESER, B. K.; HILL, J. E.; JACKSON, M. L.; KIDNEY, B. A.; MAYER, M. N.; TOWNSEND, H. G. G.; ALLEN, A. L. Localization of Bovine papillomavirus in equine sarcoids and inflammatory skin conditions of horses using laser microdissection and two forms of DNA amplification. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, p. 32-41, 2012.

WOSIACKI, S. R.; REIS, A. C. F.; ALFIERI, A. F. A.; ALFIERI, A. A. Bovine papillomavirus type 2 in enzootic haematuria aetiology. **Semina, Ciências Agrárias**, v. 23(1), p. 121-130, 2002.

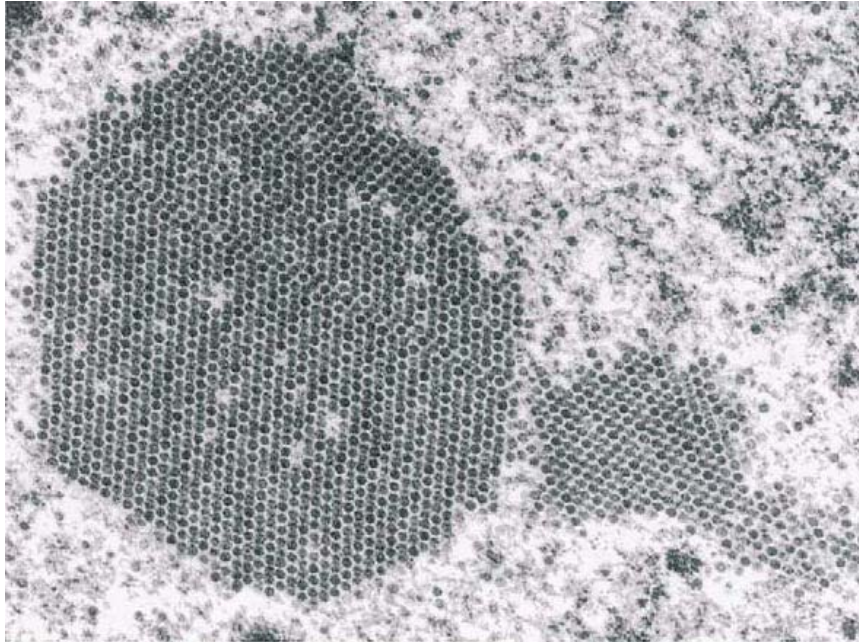
ZHENG, Z. M.; BAKER, C. C. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 2286-2302, 2006.

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

ZUR HAUSEN, H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 186, p. 131-156, 1994.

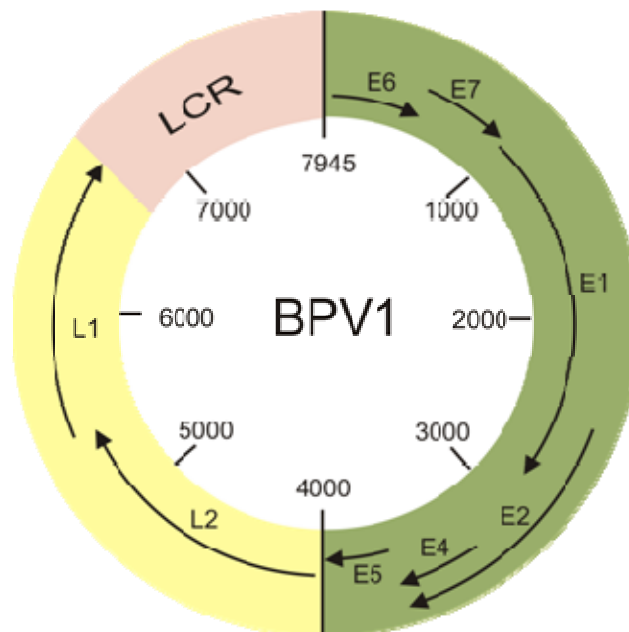
FIGURAS

Figura 1 – Microscopia eletrônica do papilomavírus canino tipo 1 (CPV1) em papiloma oral canino apresentando padrão paracristalino



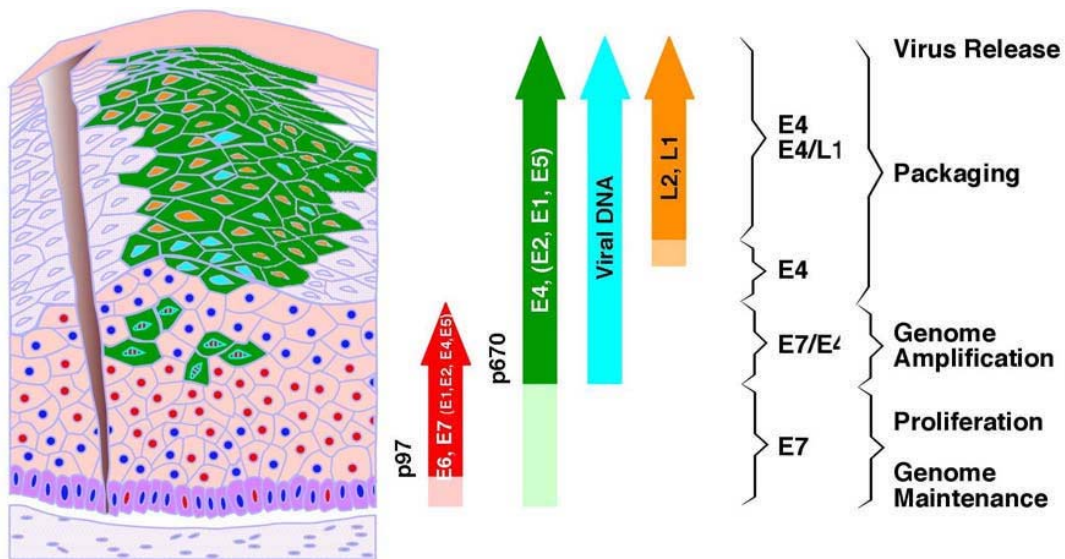
Fonte: Campo (2002).

Figura 2 – Organização genômica do papilomavírus bovino 1 (BPV1), mostrando os genes E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1, L2 e a região longa de controle (LCR) entre a L1 e E6.



Fonte: Otonel, R. A. A. (Laboratório de Virologia Animal / DMVP / CCA, Universidade Estadual de Londrina).

Figura 3 – Representação esquemática da replicação do papilomavírus humano (HPV16). O epitélio diferenciado está representado esquematicamente no lado esquerdo e os marcadores são expressos representados como setas à direita. Seguindo o acesso à camada basal, o vírus infecta a célula. As proteínas E6 e E7 (núcleos vermelhos) são expressas a partir do promotor precoce, p97 no HPV16, nas camadas inferiores do epitélio (seta vermelha). Os círculos azuis representam núcleos de células não infectadas ou não permissivas, os núcleos vermelhos representam as células infectadas. A expressão do gene E4 e, provavelmente, de outras proteínas (verde) ocorre a partir do promotor p670 no HPV16 (seta verde). A expressão das proteínas do cápsido (L1 e L2) do vírus é representada pela seta cor laranja.



Fonte: Zheng e Baker (2006).

2 OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

- Definir a epidemiologia molecular do Papilomavírus bovino (BPV) em uma coleção de 20 espécimes de sarcoide equino provenientes de quatro diferentes regiões geográficas do Brasil.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar por histopatologia lesões cutâneas classificadas clinicamente como sarcoide;
- Amplificar por PCR fragmentos do genoma dos BPVs, empregando *primers* genéricos desenhados a partir da ORF L1 e *primers* específicos que amplifica um produto localizado na ORF E5 e parte da L2 dos BPVs dentro do gênero *Delpapillomavirus*;
- Identificar eventuais novos tipos de PVs que possam estar associados a lesões de sarcoide equino utilizando os *primers* FAP;
- Sequenciar os produtos obtidos a partir da PCR;
- Realizar a análise filogenética comparando as sequências obtidas com as disponíveis em bases públicas de dados;
- Definir os tipos de BPVs prevalentes nas lesões avaliadas.

Characterization of Bovine *Deltapapillomavirus* (BPV1, 2, and 13) DNA in Equine Sarcoid¹

Summary: Sarcoids are fibroblastic tumors, which are considered the most common skin tumors of equine and rarely show spontaneous regression. The bovine papillomavirus (BPV) types 1 and 2 are classically involved in the pathogenesis of sarcoid, and probably the new BPV type (BPV13) described here also have a participation in the pathogenesis of sarcoid. The present study aimed to characterize the BPVs DNA in equine sarcoid from 15 horses of four geographic Brazilian regions. In total, 20 samples of cutaneous lesions were processed, 12 of fresh tissue and 8 of formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. The samples were confirmed as sarcoid by routine histopathology. Three primer sets were used to amplify the BPV DNA. The consensus primer set IFNR-2 and IDNT-2 was used for screening to amplify a 102 bp fragment of the papillomavirus (PV) L1 ORF. The second primer set used is complementary to a common sequence of the E5L2 genomic region of BPV1, 2, and 13. The third primer pair used (FAP59 and FAP64) target a sequence of 480 bp of L1 ORF of PVs. The screening PCR yielded amplicons in all samples. Amplicons of the expected length, approximately 250 bp, were obtained in all 20 DNA samples by the PCR assay using E5L2 primer set. The FAP PCR assay yielded amplicons only in fresh samples. After direct sequencing, two phylogenetic analyses were performed, one based on fragment E5L2 and another based on the sequence of L1 obtained with FAP primer. In E5L2 amplicons, from the 20 sarcoid samples, were identified BPV1, 2, and 13 in 14 (70%), 2 (10%), and 4 (20%) sarcoids specimens, respectively. FAP amplicons allowed identifying BPV1, 2, and 13 only in fresh tissue samples, and the results were similar with E5L2 primers. In two equines with multiple lesions it was possible to evaluate more than one sarcoid tumor. One animal showed single infection with BPV1 and the other animal presented mixed infection with the three types of bovine *Deltapapillomavirus* (BPV1, 2, and 13). For the first time in a case of mixed infection in sarcoids, the three types of bovine *Deltapapillomavirus* were identified in a single animal. This study confirms the involvement of BPV1 and 2 in the pathogenesis of sarcoid and also showed the importance of BPV13 in the etiopathology of this fibroblastic tumor.

Key words: Equine health. Equine tumor. Bovine papillomavirus. Histopathology. BPV13.

1 Introduction

Sarcoids are fibroblastic tumor and the most common cutaneous tumors of equine that can occur all over animal body. Sarcoids rarely show spontaneous regression. The equine sarcoids have a significant impact on equine health and welfare, due to difficult treatment and frequent recurrence following surgical intervention (Nasir and Campo 2008). Besides equines, this tumor can occur in a variety of animal, including zebras (Van Dyk *et al.* 2009), donkeys, mules (Reid *et al.* 1994), and captive tapirs (Kidney *et al.* 2008).

¹ Artigo editado de acordo com as normas de publicação do periódico **Equine Veterinary Journal**, disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1001/\(ISSN\)2042-3306/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1001/(ISSN)2042-3306/homepage/ForAuthors.html).

The lack of population data and the low prevalence of disease have been the greatest obstacle to set epidemiologic features of the equine sarcoid, being possible to study the disease only in individual case or in small groups (Reid *et al.* 1994; Brum *et al.* 2010; Wobeser *et al.* 2010).

The studies show that the bovine papillomavirus types 1 and 2 (BPV1, and 2) are involved in the pathogenesis of equine sarcoid (Lancaster *et al.* 1979; Bogaert *et al.* 2007). The episomal BPV DNA is detected into the fibroblast nuclei (Amtmann *et al.* 1980) and the BPV1 DNA can also be isolated in epidermis of sarcoids (Brandt *et al.* 2011). However, the BPV DNA has also been isolated in normal skin of horses (Bogaert *et al.* 2008), therefore the BPV infection is not sufficient for sarcoid development. The inflammatory skin conditions could induce the expression of oncoproteins E5 and E7 of BPV, consequently occurring cell transformation (Borzacchiello *et al.* 2008; Wobeser *et al.* 2012).

According to Knottenbelt *et al.* (2005), in spite of the sarcoids present the similar histological characteristics; they can be clinically classified to six different clinical types, defined as occult, verrucous, fibroblastic, nodular, mixed sarcoid, and malevolent sarcoid. However, there is not an association between the BPV type and the clinical classification (Nasir and Campo 2008).

There are thirteen BPV types identified and characterized from cattle. The BPVs types are classified in genera *Deltapapillomavirus* (BPV1, 2, and 13); *Xipapillomavirus* (BPV3, 4, 6, 9, 10, 11, and 12); and *Epsilonpapillomavirus* (BPV5 and 8). The BPV7 have not been yet designated into a papillomavirus (PV) genus (Bernard *et al.* 2010; Lunardi *et al.* 2013).

The most recent BPV described was the BPV13 (GenBank access number JQ798171.1) (Lunardi *et al.* 2013), which was originally designated as BPV/BR-UDEL4 GenBank access EU293540.1) (Claus *et al.* 2008). Previously studies indicate a possible association of this new BPV type with the pathogenesis of sarcoid (Silva *et al.* 2010; Lunardi *et al.* 2013b in press).

In Brazil, most studies on equine sarcoid approached only clinical, epidemiological, and histopathological aspect of the lesions (Brum *et al.* 2010; Souza *et al.* 2011). This study aimed to characterize the BPVs DNA types isolated in equines cutaneous lesions classified as sarcoid in Brazil.

2 Materials and Methods

2.1 – Cutaneous Lesions

Twenty cutaneous lesions samples, clinically classified as sarcoid, were processed, 12 of fresh tissue, and 8 of formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. The sarcoid samples were obtained from 15 animals in three Brazilian states and Distrito Federal (Santa Catarina, $n=3$; Paraná, $n=4$; São Paulo, $n=6$ and Distrito Federal, $n=2$). The three samples from Santa Catarina state and five from São Paulo state were FFPE tissue. The oldest FFPE tissue sample was from 2001. Two equines, both from Paraná state, had multiples lesions therefore had more than one skin lesion evaluated (Table 1). Only two animals, both from the same herd (herd E, table1), never have direct contact with cattle.

2.2 – Histopathology

All fresh tissue cutaneous lesions had a fragment fixed in 10% neutral buffered formalin solution, embedded in paraffin and routinely processed for histopathological evaluation. The FFPE samples were also submitted to histopathological evaluation. Then sections (5 μm) were stained with hematoxylin and eosin (HE).

2.3 – DNA Extraction

The DNA from sarcoid fresh samples was extracted using the commercial kit Qiagen DNeasy blood & tissue kit (Qiagen Sample & Assay Technologies, Hilden, Germany) and DNA extraction of FFPE tissue was performed with the Qiagen DNeasy FFPE tissue (Qiagen Sample & Assay Technologies, Hilden, Germany), in accordance with the manufacturer's instructions. Except that the suggested treatment with xylene in room temperature was replaced by xylene at 56°C. The microtome blade was changed for each sample to avoid cross-contamination.

Aliquots of ultrapure sterile water were used as negative control in the DNA extraction procedures.

2.4 – PCR Assay

In order to detect papillomavirus (PVs) DNA that might have been associated with the equine sarcoids, three different primer set were evaluated (Table 2). The consensus primer pair IFNR-2/IDNT-2 was used as screening test; this primer pair amplifies a 102 bp fragment of PVs L1 gene (Kidney *et al.* 2001). The second primer pairs used is complementary to a common sequence, with approximately 250 bp, of the E5L2 open reading frame (ORF) of both BPV1 and BPV2, according to Teifke *et al.* (2003) and Bogaert *et al.* (2005). The third PCR assay was carried out using the primer pair FAP59/FAP64 (Forslund *et al.* 1999), whose target sequence is a fragment of approximately 480 bp of the L1 gene of several PV strains. The FAP PCR was performed according to Claus *et al.* (2007). Aliquots of 5 μ L 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. The agarose gel was stained with ethidium bromide (0.5 mg/mL) and visualized under UV light.

2.5 – Sequence Analysis

The PCR products were purified using illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), and quantified using Quant-iTTM dsDNA BR Assay kit (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in the QubitTM Fluorometer (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The direct sequencing was performed by using the BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) with the forward and reverse corresponding primers, in the 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, USA), according to the manufacturer's instructions. The obtained sequences were examined with the PHRED software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>) 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 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/cgi-bin/phph/cap3.pl>) and the sequence identity was verified with all sequences deposited in the GenBank using the BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.6 – Phylogenetic Analysis

A multiple alignment was performed in CLUSTAL W (version 1.4) using MEGA package version 5.1 software and sequence identity matrix using BioEdit software version 7.0.8.0. Phylogenetic trees were obtained by the Maximum-likelihood method with the Kimura two parameter distance estimate (Kimura, 1980), using MEGA package version 5.1 software. Statistical analyses of phylogenetic trees were determined by bootstrap method on 1000 replicates.

3 Results

The 20 equine cutaneous lesions were clinically classified as fibroblastic and mixed sarcoids (Figure 1). The histopathological features of all sarcoids were similar, being formed by an extensive proliferating epidermis, which demonstrated orthokeratotic and parakeratotic hyperkeratosis, and invaded the underlying dermis with several epithelial pegs. The dermis was formed by extensive sheets of proliferating fibroblasts arranged in herringbone pattern or in interlacing bundles. The fibroblasts demonstrated discrete cellular and nuclear pleomorphism, with reduced mitotic index (Figure 2). In two samples (Table 3), the characteristic epithelial component of the lesion was absent, but the dermal component of these was similar to that observed in the sarcoids.

A product of 102 bp was present in all 20 sarcoid samples using the consensus PV primers IFNR-2/IDNT-2. The amplicons of the expected length, approximately 250 bp, were obtained in all 20 DNA samples by the PCR using E5L2 primers. PCR assay, employing the primer pair FAP, yielded DNA amplicons only in 11 samples of fresh tissue (Table 3).

From the 20 sarcoids samples that were amplified by the E5L2 PCR assay, BPV1, 2, and 13 were identified in 14 (70%), 2 (10%), and 4 (20%) sarcoids specimens, respectively. In 11 sarcoids fresh tissue samples that were amplified by FAP PCR assay, BPV1, 2, and 13 were identified in 6 (54.5%), 2 (18.2%), and 3 (27.3%) samples, respectively. The results obtained with both primers pairs were equivalent to each other (Table 3). The both animals, who have never had direct contact with cattle, presented infection by BPV1 (Table 3).

The BPV1 was identified in all three lesions from one horse that have presented multiple lesions. However, in another animal that had four lesions evaluated, despite these lesions have had the same clinical characteristic, clinically classified as mixed sarcoid according to Knottenbelt et al. (2005), was identified multiple infection caused by three distinct BPVs types (BPV1, 2, and 13).

The nucleotide identity for E5L2 fragments was 99.4 to 100% to BPV1 (14 samples); 97.8% to BPV2 (2 samples) and 99.4 to 100% to BPV13 (4 samples) (Figure 3). The nucleotide identity observed on the L1 gene fragment was 99.6 to 100% to BPV1 (6 samples); 98.8% to BPV2 (2 samples) and 99.6 to 100% to BPV13 (3 samples) (Figure 4).

The topology of the phylogenetic tree obtained for the L1 region was similar to that of E5L2 ORF. The sequences from both regions confirmed that the BPVs isolates identified in this study clustered with BPV1, 2, and 13.

4 Discussion

Sarcoid in horses has been described since the beginning of the last century as clinical illness. And since then the viral etiology has been demonstrated in several studies (Nasir and Campo 2008). Molecular studies aiming to identify the etiology of sarcoid in horses, showed that both BPV1 and 2 are associated with the sarcoid development. There have been several researches about sarcoids in Europe, USA and Canada (Angelos *et al.* 1991; Otten *et al.* 1993; Teifke *et al.* 1994; Carr *et al.* 2001; Wobeser *et al.* 2010). Although Souza *et al.* (2011) observed that the sarcoids have been the most common neoplasm in skin of horses from Southern Brazil, there are still few molecular studies of BPV DNA characterization in sarcoids in this country.

The studies about equine sarcoid etiology showed that the BPV1 was the most common BPV type found in Europe (Angelos *et al.* 1991; Teifke *et al.* 1994; Otten *et al.* 1993); in western Canada the BPV DNA most reported was the BPV2 (Wobeser *et al.* 2010). In western USA, the BPV2 was more frequent in sarcoid lesions evaluated, whereas the BPV1 and 2 were found in equal proportion in eastern of this country (Carr *et al.* 2001). Lunardi *et al.* (2013 in press) identified the new BPV type (BPV13) in six sarcoid samples from two Brazilian horses for the first time in Southern Brazil, besides Silva *et al.* (2010) identified the putative BPV13 (BPV/BR-UEL4), in one sarcoid from Southeast Brazil. This suggests the

participation of other BPV types in sarcoid etiology, and the possibility of the BPV13 being spread, and affecting several animals in this country.

The primer sets FAP59/FAP64 and E5L2fw/E5L2rv have allowed the analysis of 341 bp of L1 in 11 samples, and 185 bp of E5L2 region in 20 samples, respectively. The obtained results agree with the previous study that introduced the BPV13 as sarcoid etiologic agent (Lunardi *et al* 2013b). In this study, it was not analysed the association between the macroscopic characteristics and the viral type present in sarcoid lesions, because most lesions were clinically classified as fibroblastic sarcoids (Figure 1).

Investigations in cattle have pointed to the occurrence of infection by different BPV types in papillomas of various anatomic locations collected from the same animal (Claus *et al.* 2009). In this study, one animal, that had multiple lesions, presented only BPV1 infection; however in another equine, with four lesions, three distinct BPV types (BPV1, 2, and 13) were identified. For the first time the three BPV types, from *Deltapapillomavirus* genus could be detected in a same animal, and the both animals, with more than one lesions, were from the same herd (herd A), and it is known that they had direct contact with cattle which had previous skin papillomatosis; this direct contact can explain the diversity of BPVs type identified in this case.

The identification of BPV1 in two horses (herd E), that never had contact with cattle, led the speculation about an indirect transmission, taking into account the BPV infection in horses is abortive and nonproductive. Besides this fact, there is preliminary evidence that face flies (*Musca autumnalis*) may be vectors for BPV transmission (Nasir and Campo 2008). This is an important consideration due to the management of the prevention, however to confirm this transmission form requires more investigation.

General primers targeting the L1 gene have been used as a tool to detect putative new BPV types (Claus *et al.* 2008), however, according to PVs classification suggest by De Villers *et al.* (2004) no putative new PV types were identified in this study. The BPV1 was the predominant viral type detected in sarcoids in evaluated horses than BPV2 and BPV13, and this finding is similar to reports from European herds.

According to Brum *et al.* (2010), the fibroblastic sarcoids could be the most common clinical type found in Brazil. The lesions of the fresh samples were clinically classified as fibroblastic and mixed sarcoids in the present studied group. However, the clinical sarcoid types have not been associated to BPV types identified in these samples. Previous studies have not reported differences in sarcoid clinical, or pathogenesis, between

infection with BPV1 and BPV2 (Nasir and Campo 2008), this suggest the same could apply to BPV13, into consideration that BPV13 is closest related with BPV2 (Lunardi *et al.* 2013a).

Due to the closest relation between BPV13 and 2, previous diagnosis of PV from sarcoids, by restriction fragment length polymorphism analyses (RFLP) (Carr *et al.* 2001; Wobeser *et al.* 2010), could have misclassified BPV2 instead of BPV13; therefore we suggest submitting to sequencing all the products from PCR using broad-spectrum primers.

The BPV DNA might be detected in healthy tissue due to superficial skin contamination or latent dermal infection (Martens *et al.* 2001; Bogaert *et al.* 2008). It has been suggested that latent BPV infection in cattle and horses may be reactivated by inflammatory conditions, leading to development of cutaneous papillomas (Campo *et al.* 1994; Wobeser *et al.* 2012), and it also can occur in development of sarcoids in horses (Yuan *et al.* 2007, Bogaert *et al.* 2008). Therefore aliquots of ultrapure water were selected as negative control instead samples of clinically normal equine skin in this study.

Genomic DNA isolated from archived FFPE tissue is an important tool that allows performing retrospective studies. However, the accuracy of researches could be affected due to DNA degradation and chemical modification of DNA, and this damage can vary by time or type of fixation (Hewitt *et al.* 2008). Consequently, several commercial FFPE kits have been elaborated to improve the extraction accuracy. Fragmented DNA extracted from archival FFPE tissue allows PCR analysis only of short amplicons, rarely exceeding 300 bp, even using commercial kits (Jacobs *et al.* 2012). This explains the failure of FAP59/64 amplification in all FFPE tissue samples. Therefore the commercial FFPE kit to extraction was unsatisfactory in accomplishing the goal.

The BPV13 role in sarcoid pathogenesis is still unknown, and besides the identification of BPV13 in animals from different geographies regions (Table 3) suggest this new BPV type could be spread in other geographies regions, therefore this study collaborates to understand the sarcoid epidemiology. The identification of multiple BPV infections in horses may contribute to understand the viral evolution. There is possibility of association of new BPV types still unknown, from *Deltapapillomavirus* genus, with sarcoid development. Therefore it is necessary more studies using broadest primers to identification of putative BPV. Besides this, into consideration that immunity is type-specific and most of vaccine studies are based on BPV1 (Asharif *et al.* 2008), it is important to establish whether there is cross-infection among the new BPV types circulating.

5 References

- Amtmann, E., Muller, H., Sauer G. (1980) Equine connective tissue tumors contain unintegrated bovine papillomavirus DNA. *Journal of Virology*, **35**, 962-964.
- Angelos, J.A., Marti, E., Lazary, S., Carmichael, L.E. (1991) Characterisation of BPV-like DNA in equine sarcoids. *Archives of Virology*, **119**, 95-109.
- Ashrafi, G. H., Piuko, K., Burden, F., Yuan, Z., Gault, E. A., Müller, M., Trawford, A., Reid, S.W.J., Nasir, L., Campo, M.S. (2008). Vaccination of sarcoid-bearing donkeys with chimeric virus-like particles of bovine papillomavirus type 1. *The Journal of General Virology*, **89**, 148-157.
- Bernard, H.U., Burk, R.D., Chen, Z., Van Doorslaer, K., Zur Hausen, H., De Villiers, E.M. (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, **401**, 70-79.
- Bogaert, L., Martens, A., De Baere, C., Gasthusysl, F. (2005) Detection of bovine papillomavirus DNA on the normal skin and in the habitual surroundings of horses with and without equine sarcoids. *Research in Veterinary Science*, **79**, 253-258.
- Bogaert, L., Van Poucke, M., De Baere, C., Dewulf, J., Peelman, L., Ducatelle, R., Gasthusysl, F., Martens, A. (2007) Bovine papillomavirus load and mRNA expression, cell proliferation and p53 expression in four clinical types of equine sarcoid. *Journal of General Virology*, **88**, 2155-2161.
- Bogaert, L., Martens, A., Van Poucke, M., Ducatelle, R., De Cock, H., Dewulf, J., De Baere, C., Peelman, L., Gasthusysl, F. (2008) High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin of equine sarcoid-affected and healthy horses. *Veterinary Microbiology*, **129**, 58-68.
- Borzacchiello, G., Russo, V., Della Salda, L., Roperto, S., Roperto, F. (2008) Expression of platelet-derived growth factor- β receptor and bovine papillomavirus E5 and e7 oncoproteins in equine sarcoid. *Journal of Comparative Pathology*, **139**, 231-237.
- Brandt, S., Tober, R., Corteggio, A., Burger, S., Sabitzer, S., Walter, I., Kainzbauer, C., Steinborn, R., Nasir, L., Borzacchiello, G. (2011) BPV-1 infection is not confined to the dermis but also involves the epidermis of equine sarcoids. *Veterinary Microbiology*, **150**, 35-40.
- Brum, J.S., Souza, T.M, Barros, C.S.L. (2010) Epidemiological aspects and anatomic distribution of equine sarcoid in the state of Rio Grande do Sul, Brazil: 40 cases. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **30**, 839-843.
- Campo, M.S., Jarret, W.F.H.; O'neil, B.W., Barron, R.J. (1994) Latent papillomavirus infection in cattle. *Research in Veterinary Science*, **56**, 151-157.
- Carr, E.A., Theon, A.P., Madewell, B.R., Griffey, S.M., Hitchcock, M.E. (2001) Bovine papillomavirus DNA in neoplastic and non-neoplastic tissues obtained from horses with and without sarcoids in the western United States. *American Journal of Veterinary Research*, **62**, 741-744.
- 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. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **27**, 314-318.

- Claus, M.P., Lunardi, M., Alfieri, A.F., Ferracin, L.M., Fungaro, M.H.P., Alfieri, A.A. (2008) Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. *Veterinary Microbiology*, **132**, 396-401.
- Claus, M.P., Lunardi, M., Alfieri, A.A., Otonel, R.A.A., Sartori, D., Fungaro, M.H.P., Alfieri, A.F. (2009) Multiple Bovine Papillomavirus Infections associated with Cutaneous Papillomatosis in Brazilian Cattle Herds. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **52**, 93-98.
- De Villiers, E. M., Fauquet, C., Broker, T.R., Brenard, 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. *Journal of General Virology*, **80**, 237-243.
- Hewitt, S.M., Lewis, F.A., Cao, Y., Conrad, R.C., Cronin, M., Danenberg, K.D., Goralski, T.J., Langmore, J.P., Raja, R.G., Williams, P.M., Palma, J.F., Warrington, J.A. (2008) Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Archive of Pathology and Laboratory Medicine*, **132**, 1929-1935.
- Jacobs, S. (2012) Sample Processing Considerations for Detecting Copy Number Changes in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *Cold Spring Harbor Protocols*, **11**, 1195-1202.
- Kidney, B.A., Hains, D.M., Ellis, J.A., Burnham, B.A., Teifke, J.P., Czerwinski, M., Jackson, M.L. (2001) Evaluation of formalin-fixed paraffin-embedded tissues from vaccine site-associated sarcomas of cats for papillomavirus DNA and antigen. *American Journal of Veterinary Research*, **62**, 833-839.
- Kidney, B.A., Berrocal, A. (2008) Sarcoids in two captive tapirs (*Tapirus bairdii*): Clinical, pathological and molecular study. *Veterinary Dermatology*, **19**, 380-384.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.
- Knottenbelt, D.C. (2005) A suggested clinical classification for the equine sarcoid. *Clinical Techniques in Equine Practice*, **4**, 278-295.
- Lancaster, W.D., Theillen, G.H., Olson C. (1979) Hybridisation of bovine papillomavirus type 1 and type 2 DNA to DNA from virus-induced hamster tumours and naturally occurring equine tumours. *Intervirology*, **11**, 227-233.
- Lunardi, M., Alfieri, A.A., Otonel, R.A.A., De Alcântara, B.K., Rodrigues, W.B., De Miranda, A.B., Alfieri, A.F. (2013a) Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Veterinary Microbiology*, **162**, 207-213.
- Lunardi, M., De Alcântara, B.K., Otonel, R.A.A., Rodrigues, W.B., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F. (2013b) Bovine papillomavirus type 13 in equine sarcoids. *Journal of Clinical Microbiology*. Epub ahead of print.

- Martens, A. M., Ducatelle, R. (2001) PCR Detection of bovine papillomavirus DNA in superficial swabs and scrapings from equine sarcoids. *The Veterinary Journal*, **161**, 280–286.
- Nasir, L., Campo, M.S. (2008) Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumors of bovids and equids. *Veterinary Dermatology*, **5**, 243-254.
- Otten, N., Von Tscherner, C., Lazary, S., Antczak, D.F., Gerber, H. (1993) DNA of bovine papillomavirus type 1 and type 2 in equine sarcoids – PCR detection and direct sequencing. *Archives of Virology*, **132**, 121-131.
- Reid, S.W., Gettinby, G., Fowler, J.N., Ikin, P. (1994) Epidemiological observations on sarcoids in a population of donkeys (*Equus asinus*). *Veterinary Record*, **134**, 207-211.
- Silva, M.S., Weiss, M., Brum, M.C., Dos Anjos, B.L., Torres, F.D., Weiblen, R., Flores, E.F. (2010) Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **22**, 603-606.
- Souza, T.M., Brum, J.S., Figuera, R. A., Brass, K.E., Barros, C.S.L. (2011) Prevalence of equine skin tumors diagnosed at the Laboratory of Veterinary Pathology of the Federal University Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, **31**, 379-382.
- Teifke, J.P., Hardt, M., Weiss, E. (1994) Detection of bovine papillomavirus DNA in formalin-fixed and paraffin-embedded equine sarcoids by polymerase chain reaction and non-radioactive *in situ* hybridization. *European Journal of Veterinary Pathology*, **1**, 5-10.
- Van Dyk, E., Oosthuizen, M.C., Bosman, A.M., Nel, P.J., Zimmermand D., Venter, E.H. (2009) Detection of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected and healthy free-roaming zebra (*Equus zebra*) populations in South Africa. *Journal of Virological Methods*, **158**, 141-151.
- Yuan, Z., Philbey, A.W., Gault, E.A., Campo, S.M., Nasir, L. (2007) Detection of bovine papillomavirus type 1 genomes and viral gene expression in equine inflammatory skin conditions. *Virus Research*, **124**, 245-249.
- Wobeser, B.K., Davies, J.L., Hill, J.E., Jackson, M.L., Kidney, B.A., Mayer, M.N., Townsend, H.G.G., Allen, A.L. (2010) Epidemiology of equine sarcoids in horses in western Canada. *Canadian Veterinary Journal*, **51**, 1103-1108.
- Wobeser, B.K., Hill, J.E., Jackson, M.L., Kidney, B.A., Mayer, M.N., Townsend, H.G.G., Allen, A.L. (2012) Localization of Bovine papillomavirus in equine sarcoids and inflammatory skin conditions of horses using laser microdissection and two forms of DNA amplification. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **24**, 32-41.

Table 1 – Equine sarcoids lesions evaluated to characterize bovine papillomavirus (BPV) DNA by PCR assays.

Geografic Location	Herd	Animal	Lesion	Year of collecting
Fresh tissue				
Paraná	A	1	Eq.Sar.BRA-1.1	2011
			Eq.Sarc.BRA-1.2	2011
			Eq.Sarc.BRA-1.3	2011
	A	2	Eq.Sarc.BRA-2.1	2011
			Eq.Sarc.BRA-2.2	2011
			Eq.Sarc.BRA-2.3	2011
			Eq.Sarc.BRA-2.4	2011
	B	3	Eq.Sarc.BRA-3	2012
	C	4	Eq.Sarc.BRA-4	2012
São Paulo	D	5	Eq.Sarc.BRA-5	2012
Distrito Federal	E	6	Eq.Sarc.BRA-6	2011
	E	7	Eq.Sarc.BRA-7	2011
FFPE tissue*				
São Paulo	F	8	Eq.Sarc.BRA-8	2001
	G	9	Eq.Sarc.BRA-9	2006
	H	10	Eq.Sarc.BRA-10	2007
	I	11	Eq.Sarc.BRA-11	2009
	J	12	Eq.Sarc.BRA-12	2011
Santa Catarina	K	13	Eq.Sarc.BRA-13	2011
	L	14	Eq.Sarc.BRA-14	2011
	M	15	Eq.Sarc.BRA-15	2011

*FFPE tissue: formalin fixed paraffin-embedded tissue.

Table 2 – Oligonucleotide primers employed for PCR amplification of PVs DNA in equines sarcoids samples.

Primer	Sense	Sequence*	Position of genome	Product length	Target gene	Reference
IFNR2	Foward	5'- TTYAAYMGICCITAYTGG-3'	6517-6534	102 bp	L1 (BPV1)	Kidney <i>et al.</i> (2001)
IDNT2	Reverse	5'- ISTICCICKWGTRTRRTC-3'	6601-6618			
FAP59	Forward	5'- TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3'	5558-5578	480 bp	L1 (HPV1)	Forslund <i>et al.</i> (1999)
FAP64	Reverse	5'- CCWATATCWVHCATITCICCATC-3'	6035-6013			
E5L2fw	Forward	5'- CAAAGGCAAGACTTTCTGAAACAT-3'	3759-4002	250 bp	E5 and L2 (BPV1)	Teifke <i>et al.</i> (2003)
E5L2rv	Reverse	5'-AGACCTGTACAGGAGCACTCAA-3'	3981-4002			

*Degenerate nucleotides: I = Deoxyinosine, K = G or T, M = A or C, R = A or G, S = C or G, Y = C or T, W = A or T

Table 3 – Characterization of the bovine papillomavirus (BPVs) types identified in DNA samples of sarcoids from Brazilian horses.

Herd	Animal	Lesion	Histopathological classification	BPV type ^a	
				FAP ^b	E5L2 ^b
Fresh tissue					
A	1	Eq.Sarc.BRA-1.1	Sarcoid	1	1
		Eq.Sarc.BRA-1.2	Sarcoid	1	1
		Eq.Sarc.BRA-1.3	Sarcoid	1	1
A	2	Eq.Sarc.BRA-2.1	Sarcoid	2	2
		Eq.Sarc.BRA-2.2	Sarcoid	13	13
		Eq.Sarc.BRA-2.3	Sarcoid	2	2
		Eq.Sarc.BRA-2.4	Not determined	1	1
B	3	Eq.Sarc.BRA-3	Sarcoid	13	13
C	4	Eq.Sarc.BRA-4	Sarcoid	-	1
D	5	Eq.Sarc.BRA-5	Sarcoid	13	13
E	6	Eq.Sarc.BRA-6	Sarcoid	1	1
E	7	Eq.Sarc.BRA-7	Not determined	1	1
FFPE tissue					
F	8	Eq.Sarc.BRA-8	Sarcoid	-	1
G	9	Eq.Sarc.BRA-9	Sarcoid	-	1
H	10	Eq.Sarc.BRA-10	Sarcoid	-	1
I	11	Eq.Sarc.BRA-11	Sarcoid	-	13
J	12	Eq.Sarc.BRA-12	Sarcoid	-	1
K	13	Eq.Sarc.BRA-13	Sarcoid	-	1
L	14	Eq.Sarc.BRA-14	Sarcoid	-	1
M	15	Eq.Sarc.BRA-15	Sarcoid	-	1

^a BPV type according the highest similarity of identity matrix using BioEdit 7.0.8.0 software.

^b Result based on the alignment with the L1 fragment (341bp) and the E5L2 fragment (185bp).

Figure 1 – Cutaneous lesions from horse 6 (Distrito Federal) clinically classified as mixed sarcoïd (fibroblastic and nodular) with ulcerated regions.



Figure 2 – The histopathological features are formed by an extensive proliferating epidermis, which invaded the underlying dermis with several epithelial pegs (arrows) (A). The dermis was formed by extensive sheets of proliferating fibroblasts arranged in herringbone pattern or in interlacing bundles (arrows) (B).

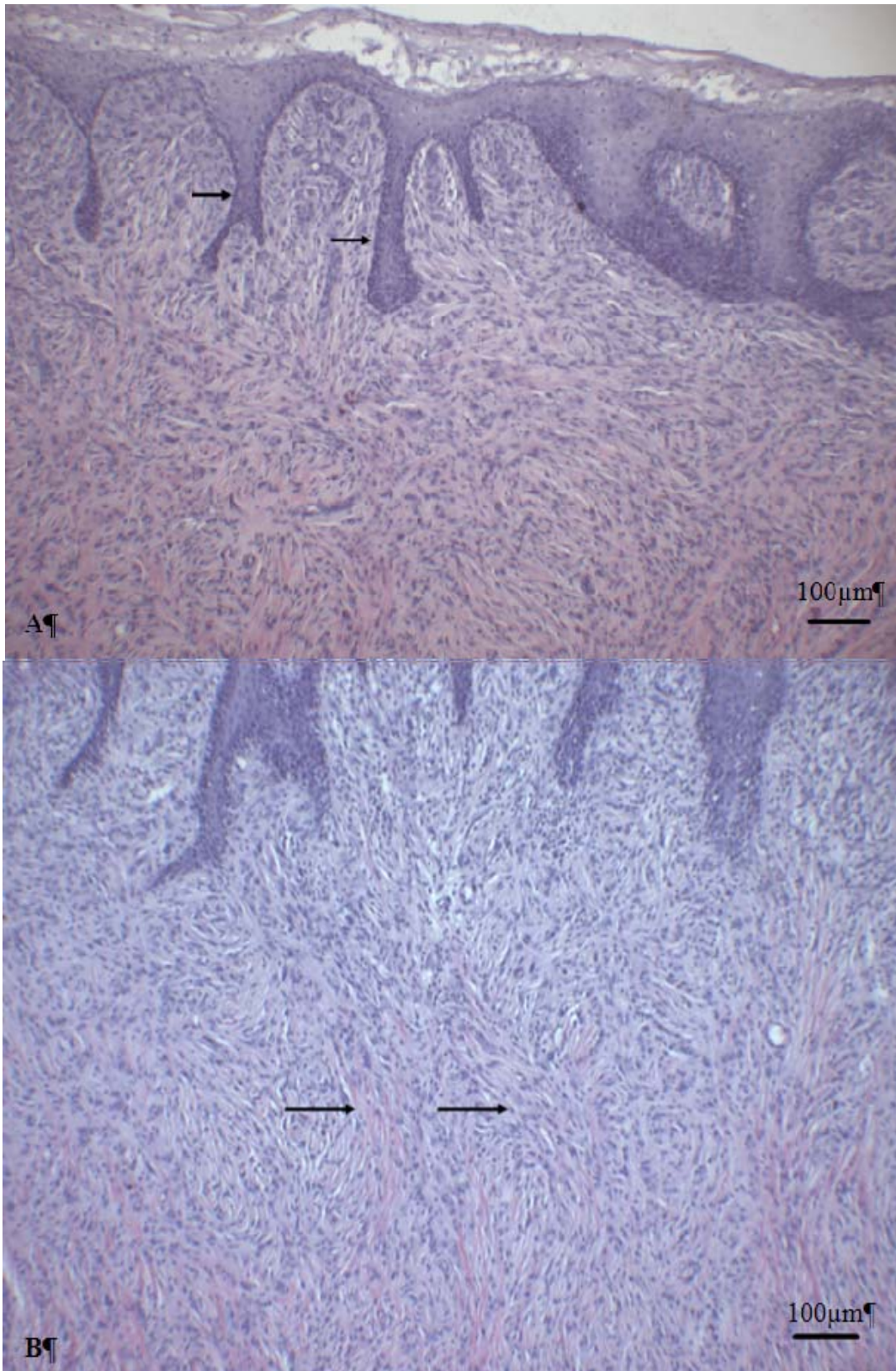


Figure 3 – Phylogenetic tree obtained by the maximum-likelihood method based on the nucleotide sequences of a 185 bp region within BPV E5L2 gene. Bootstrap values are indicated when 50% as a percentage was obtained from 1,000 replications. The BPVs strains are color marked, the Eq.Sar.9-BRA (blue diamond) shared 100% of nt with Eq.Sar.13 and 14; the Eq.Sar.1.1-BRA (purple diamond) shared 100% of nt with Eq.Sar.BRA-1.2; 1.3; 2.4; 4; 8; 10 and 15; the Eq.Sar.BRA-6 (yellow diamond) shared 100% of nt with Eq.Sar.BRA-12; the Eq.Sar.BRA-2.2 (red diamond) shared 100% of nt with Eq.Sar.BRA-3; the Eq.Sar.BRA-5 (green diamond) shared 100% of nt with Eq.Sar.BRA-11; the Eq.Sar.2.1 (pink diamond) shared 100% of nt with Eq.Sar.BRA-2.3. OaPV-1 was included as outgroup. BPV sequence names are labeled as follows: BLAST identification and GenBank accession number. The scale bar represents a genetic distance of 0.1 substitutions per site.

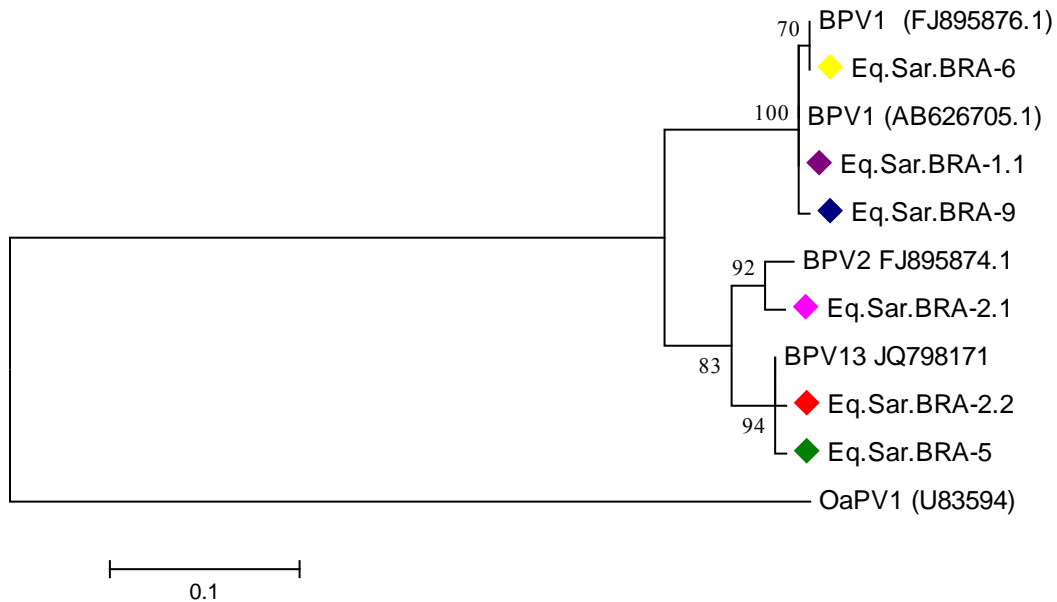
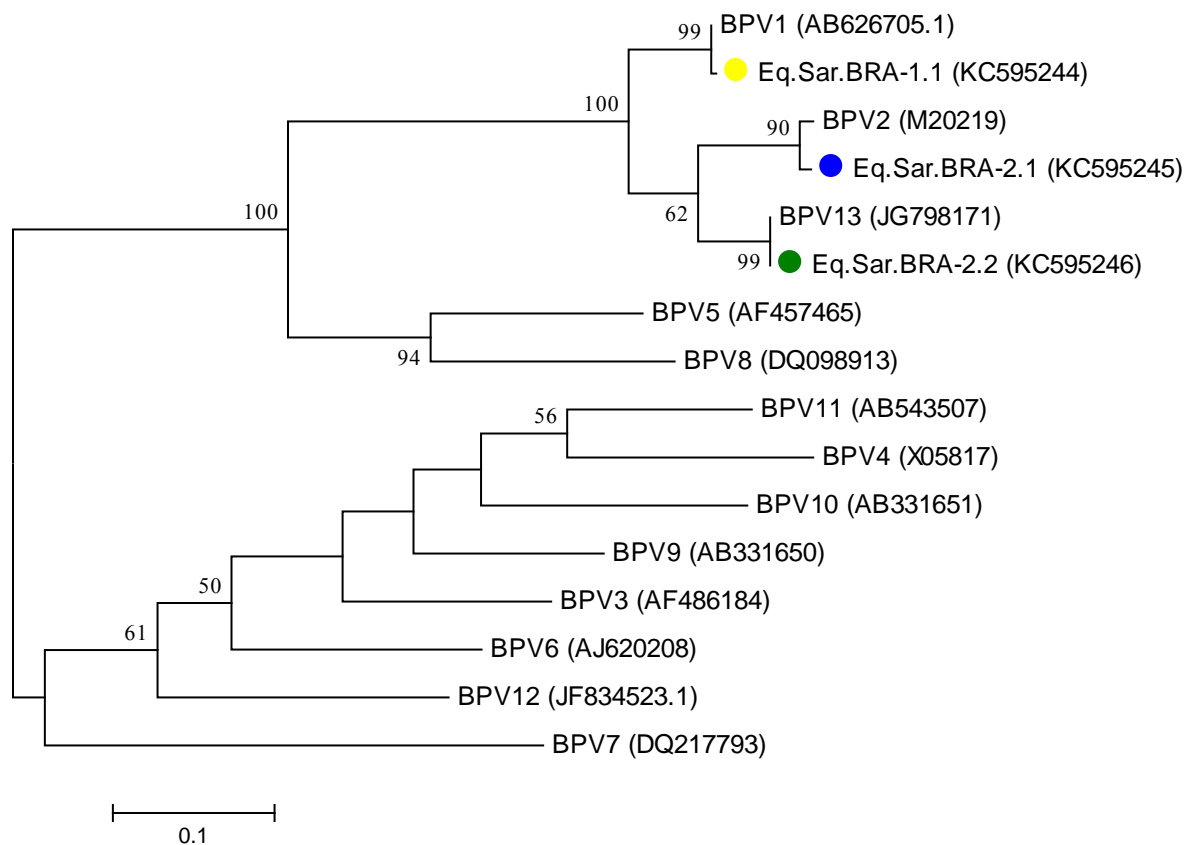


Figure 4 – Phylogenetic tree obtained by the maximum-likelihood method based on the nucleotide sequences of a 341 bp region within BPV L1 gene, 5558 to 6013 nt of BPV1, 5725 to 6199 nt of BPV2 and 5745 to 6219 nt of BPV13. Bootstrap values are indicated when 50% as a percentage was obtained from 1,000 replications. The BPV strains from *Deltapapillomavirus* genera identified in equine sarcoid lesions Eq.Sar.BRA-1.1, Eq.Sar.BRA-2.1 and Eq.Sar.BRA-2.2 are color marked as yellow, blue and green, respectively. BPV sequence names are labeled as follows: BLAST identification and GenBank accession number. The scale bar represents a genetic distance of 0.1 substitutions per site.



4 CONCLUSÕES

- As lesões cutâneas, coletadas de equinos, e classificadas clinicamente como sarcóide foram confirmados por histopatologia;
- Não houve relação do tipo de alteração histopatológica com o tipo de BPV identificado, nem relação com as características clínicas das lesões.
- A PCR, realizada com os *primers* genéricos IDNT-2/IFNR-2, foi eficaz na amplificação de um produto com aproximadamente 102 pb do gene L1 do BPV em todas as amostras de sarcoide;
- 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 somente nas amostras de material fresco de sarcoide;
- A PCR, realizada com os *primers* genéricos E5L2fw/E5L2rv, foi eficaz na amplificação de um produto com aproximadamente 250 pb do gene E5 e parte do gene L2 do BPV em todas as amostras;
- O sequenciamento de nucleotídeos dos produtos amplificados pela PCR, proporcionaram a identificação dos tipos de papilomavírus bovino (BPV1, 2 e 13), nas lesões analisadas;
- O tipo viral mais prevalente no grupo avaliado foi o BPV1;
- Lesões múltiplas de sarcoide de equinos podem ser ocasionadas por um mesmo tipo de BPV (infecções singulares) ou por mais de um tipo de BPV (infecção múltiplas) simultaneamente;
- Pela primeira vez os três tipos de BPVs do gênero *Deltapapillomavirus* foram identificados simultaneamente no mesmo animal levando à formação de sarcoides.

APÊNDICE

APÊNDICE A
Lista de Reagentes

1. 100 mM dNTP Set, 4 x 250 mL; 25 mmol 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. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
5. 2-Mercapto-ethanol (C₂H₆O₅) P.M. 78,13 (Fluka®)
6. Agarose (Gibco BRL®)
7. Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
8. Álcool isoamílico ((CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth®)
9. Azul de bromofenol (Sigma®)
10. Ethidium bromide (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma®)
11. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica®)
12. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab®)
13. Lambda DNA - (Invitrogen Life Technologies®)
14. Metanol, P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Allkimia®)
15. Platinum Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies®)
16. PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen Life Technologies®)
17. Qiagen DNeasy blood & tissue kit (Qiagen Sample & Assay Technologies®)
18. Qiagen DNeasy FFPE tissue (Qiagen Sample & Assay Technologies®)
19. Xilol (C₆H₄(CH₃)₂) P.M. 106,17 (F.MAIA Ltda.)

APÊNDICE B
Soluções e Tampões

- **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 L
- pH = 8,4

- **Tampão de Amostra**

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

- **Primers**

- INNR-2: 5'- TTYAAYMGICCITAYTGG-3'
- IDNT-2: 5'- ISTICCICKWGTRTTRTC-3'
- E5L2fw: 5'- CAAAGGCAAGACTTTCTGAAACAT-3'
- E5L2rv: 5'-AGACCTGTACAGGAGCACTCAA-3'
- FAP59: 5'- TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3'
- FAP64: 5'- CCWATATCWVHCATITCICCATC-3'

APÊNDICE C
Protocolo e Técnicas

- **Extração do DNA utilizando o kit comercial Qiagen DNeasy blood & tissue kit (Qiagen Sample & Assay Technologies®)**

- Cortar 25 mg do tecido em pequenos fragmentos e colocar em microtubo de 1,5 mL
- Adicionar 180 µL tampão ATL e 20 µL de proteinase K
- Homogeneizar em vórtex
- Incubar em banho-maria à 56°C até completar a lise
- Homogeneizar em vórtex ocasionalmente durante incubação
- Centrifugar a 10.000 x g / 30 s
- Adicionar 200 µL de tampão AL, e homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g /30 s
- Pipetar a mistura na coluna *DNeasy Mini spin column* com o tubo coletor
- Centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) /60 s e descartar o tubo coletor com o fluido
- Colocar a coluna em um novo tubo coletor
- Adicionar 500 µL do tampão AW1
- Centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) /60 s e descartar o tubo coletor com o fluido
- Colocar a coluna em um novo tubo coletor
- Adicionar 500 µL do tampão AW2
- Centrifugar a 20.000 x g (14.000 rpm) 3/min e descartar o fluido, recolocar o tubo coletor
- Centrifugar a 20.000 x g (14.000 rpm) 1/min (garantir que não haverá resíduos de tampão)
- Transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL
- Eluir o DNA adicionando 100-200 µL do tampão AE no centro da membrana da coluna
- Centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) /60 s
- Estocar a -20°C

- **Extração do DNA utilizando o kit comercial Qiagen DNeasy FFPE tissue (Qiagen Sample & Assay Technologies®)**

- Cortar em micrótomo 8 seções de 5-10 µm do material e colocar em microtubo de 1,5 mL
- Adicionar 1 mL de xilol à 56°C

- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g 2/min
- Remover o sobrenadante utilizando pipeta (Cuidado para não remover o *pellet*)
- Se necessário repetir a lavagem com xilol
- Adicionar 1 mL de etanol absoluto, para extrair o xilol residual
- Homogeneizar em vórtex
- Com o microtubo aberto, incubar à temperatura ambiente ou 37°C por 10 min ou até a evaporação do etanol
- Resuspender o *pellet* em 180 µL tampão ATL e adicionar 20 µL de proteinase K
- Homogeneizar em vórtex
- Incubar em banho-maria à 56°C até completar a lise
- Homogeneizar em vórtex ocasionalmente durante incubação
- Após a lise, incubar a 90°C por 1 h, para reverter a modificação do formaldeído do ácido nucleico
- Centrifugar a 10.000 x g /30 s para remover gotículas na tampa
- Adicionar 200 µL de tampão AL, e homogeneizar em vórtex, adicionar 200 µL de etanol absoluto imediatamente, homogeneizar novamente,
- Centrifugar a 10.000 x g /30 s
- Pipetar a mistura na coluna *QIAmp MinElute column* com o tubo coletor
- Centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) /60 s e descartar o tubo coletor com o fluido
- Colocar a coluna em um novo tubo coletor
- Adicionar 500 µL do tampão AW1
- Centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) /60 s e descartar o tubo coletor com o fluido
- Colocar a coluna em um novo tubo coletor
- Adicionar 500 µL do tampão AW2
- Centrifugar a 20.000 x g (14.000 rpm) 3/min e descartar o fluido, recolocar o tubo coletor
- Centrifugar a 20.000 x g (14.000 rpm) 1/min (garantir que não haverá resíduos de tampão)
- Transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL
- Eluir o DNA adicionando 20-100 µL do tampão AE no centro da membrana da coluna
- Centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) /60 s
- Estocar a -20°C

- **PCR utilizando IDNT2/IFNR2**

- 1x PCR buffer (50 mM KCl e 20 mM Tris-HCl [pH 8.3])
- 1,5 mM MgCl₂
- 200 µM de cada dNTP
- 1 µM de cada *primer*
- 1,5 unidades de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™, Life Technologies, USA)
- 1 µl de DNA
- Adicionar quantidade de água suficiente para (q.s.p) volume final de 25 µL
- Etapas para amplificação:
 - desnaturação inicial (3 min a 95°C)
 - 30 ciclos de: i) desnaturação por 1 min a 95°C; ii) anelamento por 30 s a 63°C; iii) extensão por 1 min a 72°C; iv) extensão final por 10 min a 72°C

- **PCR utilizando FAP59/FAP64**

- 1x PCR tampão (50 mM KCl e 20 mM Tris-HCl [pH 8.3])
- 1.5 mM MgCl₂
- 200 µM de cada dNTP
- 0.4 pmol/mL de cada *primer*
- 2,5 unidades de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™, Life Technologies, USA)
- 2,5 µl de DNA
- Adicionar quantidade de água suficiente para (q.s.p) volume final de 25 µL
- Etapas para amplificação:
 - desnaturação inicial (10 min a 94°C)
 - seguida de 40 ciclos de: i) desnaturação por 1min a 94°C; ii) anelamento por 1 min a 50°C; iii) extensão por 1 min a 72°C; iv) extensão final por 7 min a 72°C

- **PCR utilizando E5L2fw/E5L2rv**

- 1x PCR tampão (50 mM KCl e 20 mM Tris-HCl [pH 8.3])
- 1.5 mM MgCl₂
- 200 µM de cada dNTP
- 1 mM de cada *primer*

- 1,25 unidades de *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™, Life Technologies, USA)
- 1 µL de DNA
- Adicionar quantidade de água suficiente para (q.s.p) volume final de 25 µL
- Etapas para amplificação:
 - desnaturação inicial (10 min a 94°C)
 - seguida de 30 ciclos de: i) desnaturação por 30 s a 94°C; ii) anelamento por 30 s a 58°C; iii) extensão por 1 min a 72°C; iv) extensão final por 10 min a 72°C

- **Gel de agarose a 2%**

- 1 g de agarose
- 50 mL TEB buffer (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8,4
- 25 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL)

- **Purificação de produto de PCR excisado do gel**

- Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL
- Adicionar 10 µL do *Capture buffer type 2* para cada 10 mg de gel
- Incubar o tubo a 60°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min
- Centrifugar a 10.000 x g /30 s
- Transferir 600 µL da amostra com o *Capture buffer type 2* em um microtubo coletor com coluna
- Incubar a temperatura ambiente por 1 min
- Centrifugar a 13 000 g / 2 min
- Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo microtubo
- Adicionar 500 µL do *Wash buufer type 1* na coluna com microtubo coletor
- Centrifugar a 13 000 g / 1 min
- Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL
- Adicionar 30 µL do *Elution buffer type 6*
- Incubar a temperatura ambiente por 1 min
- Centrifugar a 13 000 g / 1 min
- Estocar o DNA purificado em -20°C

- **Quantificação de produto de PCR**

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

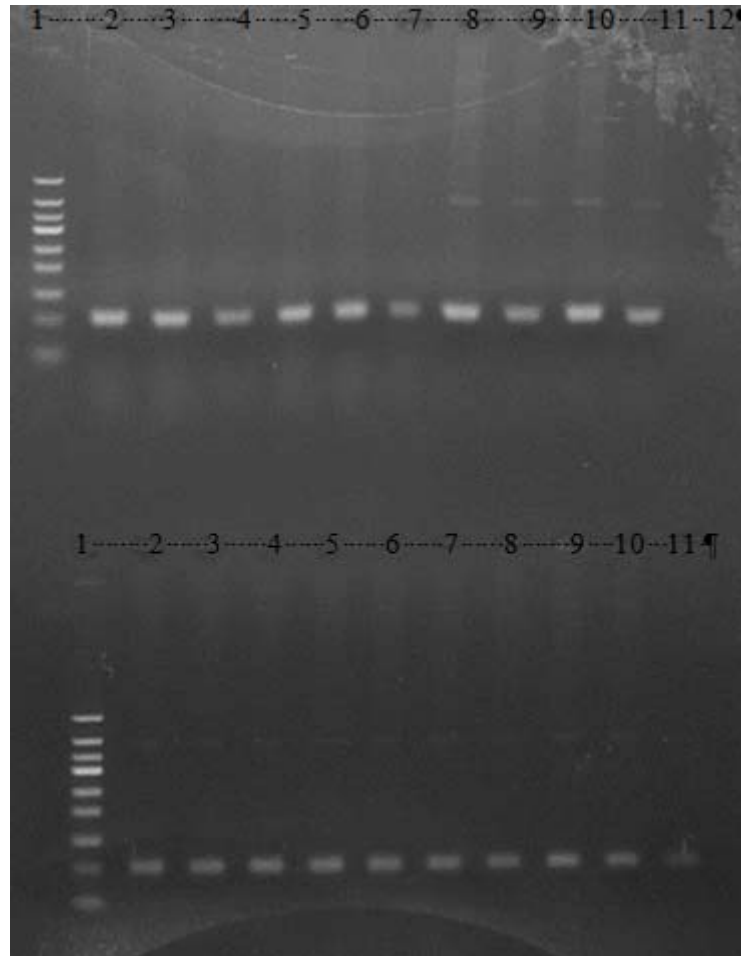
APÊNDICE D

Lista de software

- Eletroferogram quality analysis-Phred e CAP3
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>)
- BLAST The Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- MEGA package software version 4.1 (<http://www.megasoftware.net/mega4/mega41.html>)
- BioEdit software version 7.0.9.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html>)

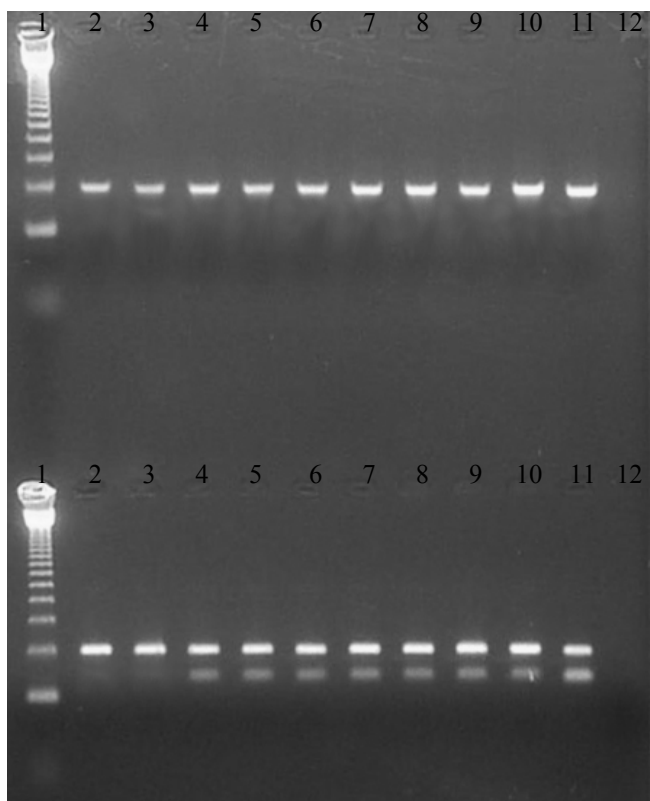
ANEXO A

Figura 1 – Fotodocumentação, eletroforese em gel de agarose 2%, dos produtos da PCR utilizando os *primers* IFNR-2/IDNT-2, que amplificam um fragmento de 102 pb do papilomavírus, nas primeiras colunas do gel superior e inferior representam o padrão tamanho molecular de 50 pb, na segunda a última estão as amostras, seguindo a ordem, Eq.Sar.BRA-1.1 à 15, e na coluna 12 do gel superior o controle negativo.



ANEXO B

Figura 2 – Fotodocumentação, eletroforese em gel de agarose 2%, dos produtos da PCR utilizando os *primers* E5L2fw/rv, que amplificam um fragmento de aproximadamente 250 pb do papiloamvírus, nas primeiras colunas do gel superior e inferior representam o padrão tamanho molecular 123 pb, na segunda a última estão as amostras, seguindo a ordem, Eq.Sar.BRA-1.1 à 15, e nas colunas 12 o controle negativo.



ANEXO C

Figura 3 – Fotodocumentação, eletroforese em gel de agarose 2%, dos produtos da PCR utilizando os *primers* FAP59/FAP64 que amplificam um fragmento de aproximadamente 480 pb do papilomavírus, nas primeiras colunas do gel superior e inferior representam o padrão tamanho molecular pb, na segunda a última estão as amostras, seguindo a ordem, Eq.Sar.BRA-1.1 à 15, e nas colunas 12 o controle negativo.

