RODRIGO PINHEIRO ARALDI

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO
PAPILOMAVÍRUS BOVINO EM GRUPO
EXPERIMENTAL DE BOVINOS PARA A OBTENÇÃO
DE UM BANCO DE VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2014

RODRIGO PINHEIRO ARALDI

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO EM GRUPO
EXPERIMENTAL DE BOVINOS PARA A OBTENÇÃO DE UM BANCO DE VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Rita de Cassia Stocco

Versão Original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Araldi, Rodrigo Pinheiro.

Isolamento e identificação do *Papilomavírus* bovino em grupo experimental de bovinos para obtenção de um banco de vírus / Rodrigo Pinheiro Araldi. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Rita de Cassia Stocco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Oncogênese viral.

Versão do título para o inglês: Isolation and identification of bovine *papillomavirus* in experimental group of cattle in order to obtain a virus bank.

1. Oncologia veterinária 2. Vírus oncogênico 3. *Papovaviridae* 4. Histopatologia animal 5. Imunohistoquímica 6. Mutagênese I. Stocco, Profa. Dra. Rita de Cassia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB090/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Rodrigo Pinheiro Arealde

Título da Dissertação: Isolamento e identificação do *Papillomavirus* bovino em grupo experimental de bovinos para obtenção de um banco de vírus.

Orientador(a): Profa. Dra. Rita de Cassia Stocco.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Isolamento e identificação do papilomavírus bovino em grupo experimental de bovinos para obtenção de um banco de vírus", protocolo nº 1035/13, sob a responsabilidade de Rita de Cássia Stocco e Rodrigo Pinheiro Araldi - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 8/5/2013.

Vigência do Projeto: 05/2013 - 03/2016 Laboratório de Genética	Nº de animais/espécie 50 bovinos <i>Bos taurus</i> adultos (M,F)
---	--

São Paulo, 10 de maio de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

Dedico este trabalho a minha tia Madalena que sempre me apoio, acreditou em meu sonho, onde parte dele se concretiza neste trabalho, e com quem sou grato de poder dividir minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha tia, Madalena, pelo apoio, atenção e carinho de sempre.

Aos meus pais Dalva e José (*in memoriam*).

À minha orientadora, Profa. Dra. Rita de Cassia Stocco, pela oportunidade de integrar-me ao seu Grupo de Pesquisa e pelos conselhos e ensinamentos que permitiram possível o desenvolvimento dessa dissertação.

À Dra. Irina Kerkis, diretora do Departamento de Genética do Instituto Butantan, por sua atenção para com o nosso grupo.

À Dra. Adriana da Costa Neves pelo suporte científico e atenção demandada no que se refere às análises histopatológicas, despertando uma curiosidade investigativa a este trabalho e meus sinceros agradecimentos as nossas tão produtivas discussões acadêmicas que enriqueceram esta pesquisa e pelos inesquecíveis conselhos pessoais.

À Dra. Sueli Assaf, que me mostrou um novo universo fantástico chamado histopatologia, sempre disponível para uma boa discussão acadêmica, como também para uma excelente conversa, trazendo sábios conselhos pessoais.

Ao Dr. Rodrigo Franco de Carvalho, por sua contribuição científica e por nossas longas discussões sobre temas associados a esta pesquisa e a tantos outros temas acadêmicos.

Ao Dr. Gérard Charles Jacques Orth, do Departamento de Virologia do Instituto Pasteur-França, um dos pioneiros no isolamento do papilomavírus e, cuja atenção e contribuição foram fundamentais para o aperfeiçoamento da metodologia empregada no presente estudo.

À Profa. Dra. Tânia Maria Araújo Domingues Zucchi (*in memoriam*), com quem tive o imenso prazer de ter trabalhado e aprendido valores profissionais e pessoais que sempre trago a minha vida pessoal e acadêmica.

À Profa. Dra. Edislane Barreiros de Souza, com que tive o privilégio de ter trabalhado ao longo de minha graduação e tenho o imenso prazer de tê-la como uma amiga.

A minha amiga Thatiana (Thati) meus profundos e sinceros agradecimentos por ter me ensinado muito a nível profissional e com quem tive longas discussões científicas que enriqueceram de modo singular minha formação e, sobretudo, alguém que levo como um modelo a ser seguido seja profissionalmente como pessoalmente, uma vez que nossa amizade se estendeu muito além do universo acadêmico e cuja amizade vou carregar para toda uma vida.

À Nara, meu muito obrigado por nossas conversas científicas e pelo bom humor que alegrou nossos dias de trabalho durante sua estada em São Paulo e, também, por toda a ajuda prestada e com quem foi, sem dúvida, um privilégio ter trabalho junto.

Aos meus colegas de laboratório Jacqueline e Thalita por nossas produtivas conversas

À Magna e a Dra. Diva D. Spadacci Morena meu sincero muito obrigado por toda a atenção e por terem acreditado e incentivado minha curiosidade investigativa.

Aos funcionários do Laboratório de Genética: Dener, sempre solícito em ajudar a todos, a Ivone, pelo trabalho exemplar de manter o laboratório organizado, a Angelina, Carla, Dilce e Olga, por toda a atenção dada.

À Danuta Iadiviga Karpinski, a quem considero parte de minha família, por nossa amizade e tão deliciosas conversas e risadas.

As minhas amigas de longas datas Thais, Thalita Biude e Eliana Tiemi Ito, obrigado por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos de minha vida e me ouvirem sempre que precisei.

A Carolina da Paz Sabino, pelo apoio acadêmico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Butantan pelo apoio financeiro.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Araldi RP. Isolamento e identificação do Papilomavírus bovino em grupo experimental de bovinos para a obtenção de um banco de vírus. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

O Papilomavírus bovino (BPV) é o agente etiológico da papilomatose bovina (PB), doença infectocontagiosa que gera importantes prejuízos econômicos à pecuária, caracterizada pela presença de papilomas que regredem espontaneamente, mas que podem persistir e progredir à malignidade. Atualmente há 13 tipos de BPVs bem descritos na literatura, além de 32 supostos novos tipos de BPVs. Este trabalho teve por objetivos isolar partículas virais de BPV, a partir de papilomas cutâneos, previamente diagnosticados e tipificados, bem como realizar o diagnóstico diferencial através de histopatologia e imunoistoquímica (IHQ) e, avaliar o potencial clastogênico do vírus *in situ*. 77 amostras de papilomas cutâneos de 27 bovinos da raça Simental foram cirurgicamente removidas. O DNA foi extraído, submetido a PCR, empregando os *primers* Delta-Epsilon e Xi. As bandas foram purificadas e sequenciadas. As sequências foram analisadas através de bioinformática e comparadas com a base de dados do GenBank, através da ferramenta BLASTn. Uma amostra representativa de cada animal foi submetida à análise histopatológica e IHQ. A avaliação da clastogenicidade foi realizada através de ensaio cometa (EC) para tecidos. A tipagem viral mostrou uma prevalência de BPV-2 em 81,81% das amostras analisadas, seguido de BPV-5, vírus associados ao desenvolvimento de fibropapilomas. Foi, também, detectada a presença do suposto novo tipo viral BR/Uel2 em uma amostra, revelando a diversidade de tipos virais circulantes no Brasil. A análise histopatológica revelou a presença de acantose, coilocitose, hipergranulose e hiperqueratose. Foi possível detectar a presença de fibroblastos transformados, o que está associado à ação combinada das proteínas E5, E6 e E7, sugerindo uma via de infecção através do sangue. Através da IHQ, foi observada a marcação de L1 na camada córnea e basal, próximo a fibroblastos transformados, sendo este um indício de infecção produtiva em outros sítios menos diferenciados. Foi observada uma expressiva marcação da oncoproteína E7 em todas as camadas do epitélio e no estroma, demonstrando a atividade viral em fibroblastos, sustentando o papel transformador do BPV nestas células. O EC mostrou a ação clastogênica do BPV-2, 5 e 9, onde não foi observada diferença estatística significativa entre os tipos virais. Os achados sustentam o papel oncogênico no BPV no estabelecimento de um microambiente favorável à malignização. O isolamento viral foi realizado através de ultracentrifugação em densidade única de cloreto de cério, empregando uma nova metodologia, a qual se mostrou menos laboriosa do que aquelas já descritas, envolvendo menos etapas de centrifugação, permitindo o isolamento de partículas completas de BPV-2, iniciando o banco de vírus do Laboratório de Genética do Instituto Butantan. A nova metodologia proposta pode ser empregada com igual êxito no isolamento de outros papilomavírus.

Palavras-chave: Oncologia veterinária. Vírus oncogênico. Papovaviridae. Histopatologia animal. Imunohistoquímica. Mutagênese.

ABSTRACT

Araldi RP. Isolation and identification of Bovine papillomavirus in experimental group of cattle in order to obtain a virus bank. [dissertation (Masters thesis in Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The bovine papillomavirus (BPV) is the etiological agent of bovine papillomatosis, infectious disease that causes significant economic losses to livestock. It is characterized by the presence of papillomas that regress spontaneously, but can persist and progress to malignancy. Currently, there are 13 types of BPVs described in the literature and 32 putative new types of BPVs. The study aimed to isolate viral particles of BPV from skin papillomas, previously identified and typified. Also, we performed the differential diagnosis by histopathology and immunohistochemistry (IHC) and, evaluate the clastogenic potential of the virus *in situ*. 77 cutaneous papilloma samples of 27 cattle of Simmental breed were surgically removed. The extracted DNA was subjected to PCR using *Delta-Epsilon* and *Xi* primers. The bands were purified and sequenced. The sequences were analyzed using bioinformatics and compared to the GenBank database, by BLASTn tool. A representative sample from each animal was subjected to histopathological and IHC analysis. The evaluation of clastogenicity was performed using the comet assay (CA) method for tissues. The viral typing showed a prevalence of BPV-2 in 81.81% of the samples, followed by BPV-5, viruses associated with the development of fibropapillomas. It was also detected the presence of the putative new virus type BR/UEL-2 in one sample, showing the diversity of circulating virus types in Brazil. Histopathological analysis revealed the presence of acanthosis, koilocytosis, hypergranulosis and hyperkeratosis. It was possible to detect the presence of transformed fibroblasts, which is associated with the combination of E5, E6, and E7 proteins, suggesting a pathway of infection through blood. By IHC, it was detected the labelling of L1 in corneal and basal layer, near the transformed fibroblasts, labelling indicating productive infection at other sites less differentiated. An expressive E7 labelling was observed in all layers of the epithelium and stroma, demonstrating the viral activity in fibroblasts. The CA analysis showed the clastogenic action of BPV-2, 5 and 9, although no statistically significant difference between viral types was observed. The findings support the oncogenic action of BPV in establishing of favorable microenvironment for malignant transformation. Virus isolation was performed by ultracentrifugation in single density of cesium chloride, using a new method, which is less laborious than those already described, involving fewer steps of centrifugation, allowing the isolation of entire particles of BPV-2, composing the virus stock of Laboratory of Genetics of Butantan Institute. The new proposed methodology can be used with equal success in isolation of other papillomaviruses.

Keyword: Veterinary oncology. Oncogenic virus. Papovaviridae, Animal histopathology. Immunohistochemistry. Mutagenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização dos 13 tipos descritos de BPVs de acordo com seus respectivos gêneros.....	23
Figura 2 – Fotomicroscopia eletrônica do BPV.....	25
Figura 3 – Genoma do papilomavírus bovino e o papel dos respectivos genes.....	26
Figura 4 – Ação combinada das oncoproteínas E5, E6 e E7.....	29
Figura 5 – Modelo esquemático de infecção pelo papilomavírus.....	32
Figura 6 – Expressão diferencial das proteínas do BPV.....	33
Figura 7 – Identificação de BPV em outros sítios.....	34
Figura 8 – Papilomatose bovina observada em um animal de um ano, no qual se observa inúmeros papilomas cutâneos na região de cara e pescoço.....	35
Figura 9 – Samambaia <i>P. aquilinum</i> e suas substâncias carcinogênicas e imunossupressoras	37
Figura 10 – Classificação dos papilomas.....	38
Figura 11 – Classificação dos nucleóides de acordo com o dano no DNA.....	54
Figura 12 – Esquema da coleta das partículas virais de BPB por aspiração após a ultracentrifugação.....	56
Figura 13 – Resultado do teste de <i>primers</i> específicos para BPV-1 e 2.....	59
Figura 14 – Resultado do teste de <i>primers</i> degenerados FAP59/64, MY09/11, <i>Delta-Epsilon</i> e <i>Xi</i>	61
Figura 15 – Distribuição dos papilomas de acordo com a região anátomo-topográfica.....	64
Figura 16 – Alinhamento da sequência do suposto novo tipo viral identificado (BR/UEL-2).....	65
Figura 17 – Análise histológica comparativa entre tecido normal e infectado por BPV.....	68
Figura 18 – Análise histopatológica comparativa de papiloma e fibropapiloma.....	70
Figura 19 – Análise histopatológica de fragmento cutâneo de papiloma.....	70

Figura 20 – Fotomicrografia de fibroblastos transformados.....	74
Figura 21 – Marcação imunoistoquímica da proteína L1.....	77
Figura 22 – Marcação imunoistoquímica da oncoproteína E7.....	79
Figura 23 – Imagem de cometas sem dano e com dano máximo.....	84
Figura 24 – Esquema de sinergismos epitélio-estroma.....	86
Figura 25 – Vírions de BPV isolados a partir de amostras de papilomas.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo da função das proteínas codificadas pelo genoma do BPV.....	31
Tabela 2 – Sequências dos iniciadores específicos e degenerados empregados na identificação de BPV.....	49
Tabela 3 – Parâmetros da reação de PCR empregando os diferentes pares de iniciadores.....	50 82
Tabela 4 – Número de cometas observados por classe	
Tabela 5 – Resultado do teste <i>post-hoc</i> de Dunn, revelando diferenças estatísticas significativas entre animais infectados e não infectados (controles).....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina Trifosfato

BPV – Papilomavírus bovino

Brd4 – Bromodomínio 4

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dsDNA – dupla-quebra de DNA

E2BS – E2 *binding site*

ECR – *Early Control Region*

HPV – Papilomavírus humano

IHQ – Imunoistoquímica

LCR – *Long Control Region*

Kb - Kilobase

KDa – Kilodalton

ml - mililitro

mRNA – RNA mensageiro

nm - nanômetro

NCR – *Non-coding Region*

Ori – Origem de replicação

ORF – *Open Reading Frame*

pb – pares de base

PB – Papilomatose bovina

PDGFβR – *Platelet-derived Growth Factor Beta Receptor*

PV – Papilomavírus

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA – Ácido ribonucleico

SCGE – *Single Cell Gel Electrophoresis*

URR – *Upstream Regulatory Region*

SMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	O Papilomavírus bovino (BPV)	21
2.2	As proteínas expressas pelo BPV e suas respectivas funções	26
2.3	A infecção pelo Papilomavírus bovino (BPV)	31
2.4	Aspectos clínicos e eventuais tentativas terapêuticas da Papilomatose bovina (PB)	34
2.5	A correlação entre a Hematúria Enzoótica Bovina (HEB), a ingestão de samambaia e o BPV na gênese de tumores malignos de bexiga e esôfago	36
2.6	Aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos da Papilomatose bovina	38
2.7	O Diagnóstico do BPV	39
2.8	Ensaio Cometa como Indicador de Atividade Viral	40
2.9	Isolamento de vírions de BPV para estratégias vacinais	40
3	OBJETIVOS	42
3.1	Objetivo Geral	43
3.2	Objetivos Específicos	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1	Coleta das Amostras de Tecido e Análise Histopatológica	45
4.2	Extração, quantificação e análise da qualidade do DNA	46
4.3	Obtenção dos genomas virais para teste de <i>primers</i> e controles positivos para PCR	47
4.4	Teste de <i>primers</i> para otimização de diagnóstico molecular	48
4.5	Identificação e Tipagem Molecular de BPV	50
4.6	Imuno-deteccção das Proteínas L1 e E7 em Amostras de Tecido Parafinado através de Imuno-histoquímica	51
4.7	Ensaio cometa de amostras de papilomas cutâneos	52
4.8	Isolamento de Vírions de BPV para a Construção de Banco de Vírus	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	Teste de <i>primers</i> específicos e degenerados na identificação de sequências de BPV	58
5.2	Identificação e Tipagem de BPV	63
5.3	Análise Histopatológica	67
5.4	Imunoistoquímica	76
5.5	Ensaio Cometa	79
5.6	Isolamento Viral	86

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
REFERÊNCIAS*	96
APÊNDICE A – Resultados do Diagnóstico	112
APÊNDICE B – Artigo submetido	116

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho bovino de aproximadamente 210 milhões de cabeças, configurando o segundo maior produtor mundial de carne, leite e couro. Entretanto, alguns entraves ainda prejudicam a balança comercial agropecuária, tais como a febre aftosa e a papilomatose bovina (PB) (Carvalho et al., 2012).

O Papilomavírus bovino (BPV) é o agente etiológico da PB, doença infectocontagiosa, caracterizada pela presença de lesões hiperproliferativas (papilomas) que regredem espontaneamente, mas que podem persistir e, na presença de fatores genéticos e/ou ambientais, podem progredir à malignidade (Freitas et al., 2011; Nascimento et al., 2012; Tuk et al., 2005; Yagui et al., 2006).

Embora muitas vezes negligenciada, a PB gera importantes prejuízos econômicos à pecuária, pois leva à queda da produção leiteira, decorrente de quadros de mastites e da obstrução dos tetos, dificultando a colocação da ordenhadeira mecânica, ao mesmo tempo em que desvaloriza os animais e deprecia o couro (Monteiro et al., 2008).

Atualmente há treze tipos de BPV descritos na literatura, classificados em três gêneros: *Deltapapillomavirus* (BPV-1, 2 e 13), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 e 8) e *Xipapillomavirus* (BPV-3, 4, 6, 9, 10, 11 e 12). O BPV-7 permanece não classificado em nenhum gênero (Lunardi et al., 2012). Além destes, há mais de 32 supostos novos tipos de BPVs (White, Howley, 2013). Embora considerado espécie-específico, o BPV-1, 2 e 13 pode infectar cavalos, mulas, zebras e búfalos resultando em sarcomas, tumores invasivos, porém não metastásicos (Lunardi et al., 2013; Wobeser et al., 2012).

O BPV possui um genoma circular, de aproximadamente 8 Kb, dividido em três regiões: região de controle precoce (ECR – *Early Control Region*) - que codifica as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7 - tardia (LCR – *Late Control Region*) – que codifica as proteínas estruturais L1 e L2 que constituem o capsídeo - e não codificante (NCR – *Non-Coding Region*) (Borzachiello, 2007).

As oncoproteínas codificadas pelo BPV (E5, E6 e E7) estão envolvidas em vários passos da transformação celular e apresentam ação clastogênica, levando à instabilidade genômica, a qual está diretamente associada à carcinogênese (Araldi et al., 2013, Fernandes et al., 2013; Stocco dos Santos et al., 1998).

A transmissão do BPV pode se dar através do contato entre animais infectados ou da exposição a áreas contaminadas por partículas virais tais como: ordenhadeira mecânica, bebedouro, comedouro, cordas e cercas (McBride et al., 2012). Em todas as formas de contágio faz-se necessária a presença de uma lesão tecidual, permitindo a exposição de peptideoglicanos

de sulfato de heparina, sítio de ancoragem da proteína L1, resultando na endocitose viral (Fernandes et al., 2013).

A infecção pelo papilomavírus inicia-se na camada basal do epitélio, aonde o genoma viral se mantém em nível reduzido de cópias e, à medida que ocorre a diferenciação celular da epiderme, há a replicação viral e a expressão temporal de proteínas do capsídeo, resultando na montagem de partículas virais (McBride et al., 2012). Este processo configura um sistema de replicação dependente de diferenciação, o que resulta na inexistência de um sistema da propagação viral *in vitro* (White, Howley, 2013).

Neste cenário, o isolamento viral é essencial à obtenção de informações físico-químicas, bioquímicas e biológicas das viroses, contribuindo sobremaneira em estudos sorológicos e na validação de produtos vacinais (Alli, Rossinck, 2007). Há diversas metodologias para a purificação de BPV, todas baseadas em ultracentrifugação em gradientes de cloreto de cério (Buck et al., 2004; Bujard, 1967) ou de sacarose (Favre et al., 1975; Liu et al., 1997). Entretanto, as técnicas de purificação de virions de DNA são laboriosas e englobam complicados procedimentos para a obtenção de quantidades de vírions suficientes após a ultracentrifugação (Wang et al., 2007), justificando a necessidade de investimentos em novas metodologias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Papilomavírus bovino (BPV)

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014), o Brasil possui o segundo maior rebanho bovino efetivo do mundo, com um total de aproximadamente 210 milhões de cabeças. Desde de 2004, o país tornou-se líder mundial nas exportações de carne e seus derivados, exportando para mais de 180 países (Carvalho et al., 2012). O clima tropical e a extensão territorial do Brasil garantem as áreas de pastagem e fazem da bovinocultura um dos principais destaques do agronegócio.

Segundo o MAPA, de 1960 a 2010 houve um aumento de 251% do número de cabeças e um aumento de 39% das áreas de pastagens para o mesmo período, indicando um elevado aumento da pecuária intensiva. Entretanto, alguns entraves como a febre aftosa e papilomatose bovina, geram importantes impactos econômicos aos produtores, afetando a produção nacional (Pacheco, 2006).

O Papilomavírus (PV) é um grupo de vírus oncogênicos, pertencente à família *Papillomaviridae*, que apresenta tropismo para tecido epitelial escamoso e mucoso, afetando todos os amniotas (Alberti et al., 2011; Rogovskyy et al., 2012; White, Howley, 2013). Este fato leva à inclusão de primatas e bovinos, estando associado às lesões epiteliais benignas (papilomas) e malignas (Borzacchiello et al., 2007; Freitas et al., 2003; Freitas et al., 2007; Freitas et al., 2011; Kirnbauer et al., 1996; Larsen et al., 1987; Stocco dos Santos et al., 1998; Roperto et al., 2008; Silva et al., 2012; Zheng, Baker, 2006; You, 2010).

A presença de lesões verrucosas em animais foi descrita já no século IX, em equinos (Lancaster, Olson, 1982) e em canídeos (Nicholls, Stanley, 2000). Entretanto, foi somente em 1933 que o vírus foi isolado a partir de lesões de coelhos (Shope, Hurst, 1933; Leto et al., 2011). Em 1935, Rous mostrou que o PV apresentava uma ação oncogênica (Crawford, Crawford, 1963). Porém a estrutura genômica do PV somente foi descrita em 1963 (Crawford, Crawford, 1963). Entretanto, os estudos do PV somente começaram a ganhar um gradual interesse a partir de 1970, após Zur Hausen ter mostrado a participação do papilomavírus humano (HPV) na etiogênese do câncer cervical (Zur Hausen, 1999; Leto et al., 2011).

O Papilomavírus bovino (BPV) tem ocorrência mundial, sendo o agente etiológico da papilomatose bovina (PB), doença infectocontagiosa, clinicamente caracterizada pela presença de lesões hiperproliferativas (papilomas) que acometem o tecido cutâneo e mucoso, causando

importantes prejuízos econômicos à pecuária (Carvalho et al., 2003; Freitas et al., 2011; Nascimento et al., 2012).

Os papilomas são lesões de aspecto verrucoso, decorrentes de infecções por papilomavírus, com consistência dura e coloração variando de entre branco-acinzentado a negra, apresentando superfície áspera e friável que se destacam facilmente, contendo abundantes corpos de cerato-hialina no estrato granuloso (Lowly et al., 2013; Fernandes et al., 2009; Rashad, Evans, 1967).

No Brasil, observa-se, independentemente do nível da exploração pecuária, a presença de infecção por BPV em rebanhos de corte (Araldi et al., prelo) e, principalmente leiteiro, havendo uma maior aptidão para este (Cascales et al., 2009). Estima-se que 60% do rebanho bovino nacional esteja infectado pelo BPV (Stocco dos Santos et al., 1998; Cartaxo et al., 2013).

De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2014) os papilomavírus são classificados em 30 gêneros de acordo com a diversidade de sequências nucleotídicas da ORF (*Open Reading Frame*) do gene L1, o mais conservado, de modo que diferenças acima de 10% entre duas sequências de DNA da mesma ORF definem um novo tipo viral, ao passo que diferenças entre 2 e 10% definem um novo subtipo viral (De Villiers et al., 2008).

Os papilomavírus são divididos em três gêneros: *Deltapapillomavirus* (BPV-1, 2 e 13), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 e 8) e *Xipapillomavirus* (BPV-3, 4, 6, 9, 10, 11 e 12), e o BPV-7 que permanece não classificado em nenhum gênero, conforme figura 1 (Freitas et al., 2011). Atualmente há treze tipos de BPV descritos na literatura, embora esse número possa ser superior a vinte (Araldi et al., no prelo; Lunardi et al., 2012). Além destes, há 16 supostos novos tipos de BPV, sendo eles: BAA-1 a -4, BAPV-3 a -5, BAPV-7 a -10, BAPPV11MY e BPV/BR-UEL-2 a -5, sendo que o BAA-1 passou a ser designado por BPV-12 (Zhu et al., 2012), embora o número de PVs continue crescendo (White, Howley, 2013).

Figura 1 – Organização dos 13 tipos descritos de BPVs de acordo com seus respectivos gêneros.

Fonte: Adaptado de Costa et al. (2013)

O BPV-1 é responsável por causar fibropapiloma peniano, BPV-2 está associado à gênese de verrugas cutâneas, hematúria enzoótica crônica (HEC), fibropapilomas digestórios e tumores na bexiga urinária (Pathania et al., 2012; Roperto et al., 2010; Tan et al., 2012), BPV-3, papilomas cutâneos, BPV-4, papilomas epiteliais do trato gastrointestinal (Shafti-Keramat et al., 2009), BPV-5/6 induzem a gênese de fibropapilomas mamários, BPV-8, associado a papiloma cutâneo e BPV-9/10, papiloma epitelial escamoso de mama (Campos et al., 2008; Melo et al., 2014; Stocco dos Santos et al., 1998). O BPV-11 está associado a papilomas cutâneos (Hatama et al., 2011) e o BPV-12, a papilomas epiteliais cutâneos e de língua (Zhu et al., 2012). Embora primeiramente descrito no Japão, o BPV-12 já foi detectado no Estado de São Paulo (Araldi et al., no prelo). O BPV-13 está associado à indução de fibropapilomas (Lunardi et al., 2013).

Os *Deltapapillomavirus* podem, também, causar sarcomas equinos, tumores fibroblásticos não metastásicos e invasivos (Anjos et al., 2010; Lunardi et al., 2013; Wobeser et al., 2012), câncer de bexiga e esôfago. Embora considerado espécie-específico (Alberti et al., 2011), os tipos virais BPV-1, 2 e 13 podem afetar cavalos, mulas, zebras e búfalos (Finlay et al., 2009). Evidências evolutivas apontam que a domesticação do gado e de cavalos proporcionou o contato físico entre estas espécies, garantindo ao BPV-1 e 2 o acesso a seu novo hospedeiro, no qual os vírus encontraram um sucesso em termos de colonização e persistência da infecção (Gottschling et al., 2011).

Embora a origem das viroses ainda permaneça incerta, a diversidade de tipos virais de Papilomavírus pode ser explicada por múltiplos mecanismos evolutivos que envolvem processos de recombinação e adaptação viral (Freitas et al., 2011). Além do mais, os vírus sofrem uma pressão evolutiva que maximiza sua capacidade de replicação e difusão, enquanto minimiza o tamanho de seu genoma (Gottschling et al., 2011; Holland, Domingo, 1998; Talbert-Slagle, Dimaio, 2009).

Estima-se que os PVs tenham surgido concomitantemente com os tetrápodes na Era Paleozóica, Período Carbonífero, há 330 milhões de anos (Rector, Van Ranst, 2013). Os PVs constituem uma das mais antigas e extensas famílias de vírus conhecida, tendo sido reconhecida como carcinógenos de tipo I pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) em 1995 (Rector, Van Ranst, 2013).

O BPV apresenta um genoma circular de 8 Kb, que quando relaxado apresenta $2,25 \mu\text{m} \pm 5\%$ (Waldeck et al., 1984) composto por DNA dupla-fita associado a proteínas semelhantes a histonas (Leto et al., 2011), envolto por um capsídeo icosaédrico, composto por 360 cópias da proteína L1 de 55 KDa (Baker et al., 1991; Liu et al., 1997), organizada em 72 capsômeros e, aproximadamente 12 cópias da proteína L2, com 39 KDa (Góes et al., 2008; Roperto et al., 2008), apresentando um peso molecular de $5,2 \times 10^6$ Da (Orth et al., 1977), estando diretamente associado a diversas patologias veterinárias, conforme figura 2 (Campos et al., 2008; Demasi et al., 2005 e 2007; Góes et al., 2008).

Os pentâmeros da proteína L1 se ligam através de pontes dissulfídicas, que estabilizam o capsídeo viral, ao passo que a proteína L2 oclui o centro de cada capsômero pentavalente (Fernandes et al., 2013).

Figura 2 – Fotomicroscopia eletrônica do BPV.

Fotomicroscopia eletrônica mostrando o DNA circular do BPV (A), reconstrução tridimensional do capsídeo viral obtida a partir de microscopia crioeletrônica (B) e partículas virais de BPV (C). Fonte: Modificado de Baker et al. (1991), Bujar et al. (1964) e Liu et al., 1997.

O genoma do Papilomavírus é dividido em três regiões: região de controle precoce (ECR – *Early Control Region*), tardio (LCR – *Long Control Region*) e não codificante (NCR – *Non-Coding Region*, também conhecida por URR – *Upstream Regulatory Region*), separadas por dois sítios de poliadenilação (Borzachiello, 2007; Leto et al., 2011; Zheng, Baker, 2006), sendo que apenas uma das fitas de DNA atua como molde para a transcrição, codificando transcritos policistrônicos de mRNA (Fernandes et al., 2013).

A ECR ocupa 50% do genoma viral, possuindo aproximadamente 4.000 pb e codifica as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7, a LCR ocupa 40% do genoma, com aproximadamente 3.000 pb e contém os genes L1 e L2, que codificam proteínas do capsídeo e a NCR que ocupa 10% do genoma, com aproximadamente 1.000 pb, não sendo codificante, entretanto, esta contém a origem da replicação e os sítios de ligação de múltiplos fatores de transcrição, importante na regulação da RNA polimerase II, conforme figura 3 (Borzachiello, 2007; Leto et al., 2011; Rampias et al., 2013; Zheng, Baker, 2006).

Figura 3 – Genoma do papilomavírus bovino e o papel dos respectivos genes.

Fonte:

Modificado

de

<http://www.microbiologybytes.com/virology/Papillomaviruses.html>

2.2 As proteínas expressas pelo BPV e suas respectivas funções

As oncoproteínas codificadas pelo BPV estão envolvidas em vários passos da transformação celular e apresentam ação clastogênica, levando a instabilidade genômica, a qual está diretamente associada à malignidade (Araldi et al., 2013, Fernandes et al., 2013; Stocco dos Santos et al., 1998).

A ORF E1 contém 1.818 pb e codifica a proteína nuclear E1, fosforilada na região N-terminal e C-terminal, com importância destacada durante a replicação viral (Campos, 2011; Enemark et al., 2000; Ferraro et al., 2011). A proteína E1 atua como uma helicase dependente de ATP, conferindo energia para hidrolisar o descondensamento da dupla-fita de DNA (Bian et al., 2007; McBride et al., 2012). Sua ligação se dá por meio de sítios específicos definidos como sequências de reconhecimento de origem (*ori*) (Castella et al., 2006).

A ORF E2 codifica a proteína E2, composta por 605 aminoácidos altamente conservados, sendo fundamental para criar um ambiente favorável para o estabelecimento da infecção, estando associada à replicação do DNA, manutenção do epissomo, transcrição viral e empacotamento do

DNA durante a montagem viral (Campo, 1997; Enemark et al., 2000; Fernandes et al., 2013; Ferraro et al., 2011; Kurg et al., 2006; McBride et al., 2012; You, 2010).

A proteína E2 se liga a cromossomos mitóticos, levando a uma distribuição eficiente do genoma do BPV nas células-filhas (Borzacchiello, 2007), tendo um papel de destaque na regulação da transcrição e replicação viral (Buck et al., 2004; Lace et al., 2012) ao passo que as proteínas E5, E6 e E7 são responsáveis pela imortalização das células transformadas (Araldi et al., 2013). Sabe-se, também, que a proteína E2 é imunogênica e, portanto, modula a resposta imune e cuja degradação resulta no aumento da expressão das proteínas E6 e E7 (Fernandes et al., 2013; Ferraro et al., 2011; Monte, Peixoto, 2010).

De acordo com Cai et al. (2013), a proteína E2 regula a repressão transcricional das oncoproteínas E6 e E7, ao se ligar a sequências palindrômicas em quatro sítios de ligação na LCR (E2BS – *E2 binding sites*). Além do mais, trabalhos recentes mostram que a proteína E2 se liga ao bromodomínio Brd4 e que tal ligação é conservada nos PVs e medeia a associação entre E2 e a cromatina, de modo que a interação E2-Brd4 vem se mostrando um alvo para o desenvolvimento de drogas antivirais (Campo, 1997; Ferraro et al., 2011; Schweiger et al., 2006).

A ORF E3 está presente na minoria dos PVs e sua função ainda permanece desconhecida (Rivoite et al., 2006). A ORF E4 encontra-se dentro da ORF E2 (Doorslaer, 2013) e codifica a proteína E4, extremamente abundante em lesões, onde representa 30% do total de proteínas (Campo, 1997), tendo como função auxiliar a penetração do vírus nas células basais, ao mesmo tempo em que está relacionado com a perturbação da integridade da queratina, sendo responsável pelo efeito citopático (Ferraro et al., 2011; Doobar, 2013; Sousa et al., 2011).

Os genes E6 e E7 se encontram na mesma ORF, sendo transcritos em um mRNA bicistrônico E6/E7, que possui um *enhancer* a montante do promotor P97 na região de controle tardio (LCR) (Cai et al., 2013). A superexpressão de E2 pode reprimir a transcrição dos genes E6 e E7 e induzir a apoptose, pois a proteína E2 pode se ligar a sequência palindrômica ACCGN4CGGT, presente em quatro sítios de ligação (E2BSs – *E2 binding sites*), incluindo o *enhancer* de P97 (Cai et al., 2013; Monte, Peixoto, 2010).

A ORF E5 codifica um polipeptídio hidrofóbico transmembrana, com atividade oncogênica (Borzacchiello, 2007; Talbert-Slagle, Dimaio, 2009). O polipeptídio E5 é composto por 44 aminoácidos, que se expressa na camada basal do epitélio infectado, sendo encontrado na membrana do retículo endoplasmático e complexo de Golgi, promovendo a alcalinização da mesma, resultando no sequestro de moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe I e II (MHC-I e II) (Borzacchiello, 2007; Campo, 2000).

A oncoproteína E5 se liga e dimeriza com o receptor do fator β de crescimento (PDGF β – *platelet-derived growth factor receptor*), formando um complexo estável, que leva a fosforilação da tirosina, induzindo a proliferação celular (Borzacchiello et al., 2006; Maiolino et al., 2013; Roperto et al., 2007), ao mesmo tempo em que resulta em uma organogênese anormal (Mariz et al., 2013). A E5 se liga, também, à subunidade vacuolar de 16 KDa do complexo H⁺-ATPase, resultando na alcalinização da membrana do Complexo de Golgi. Desta forma, o MHC-I é sequestrado, o que impede que o mesmo atinja a superfície celular (Demasi et al., 2005, 2007; Hartt et al., 2011; Nepon, 2013). Ao mesmo tempo em que promove uma redução da expressão de mRNA de MHC-I e II, E5 leva a um processo de evasão do sistema imune (Borzacchiello, 2007; Fernandes et al., 2009; Tsai, Chen, 2003).

A ORF E6 contém 414 pb e codifica uma proteína composta por 137 aminoácidos, responsável pela alteração do citoesqueleto de actina, e pela degradação proteossômica via ubiquitinação da p53 (Cheville, 2004a; Duensing, Mürnger, 2002; Zhu et al., 2012), a partir da formação do complexo E6-ubiquitina ligase (AP) (E6AP) (Liu, Baleja, 2008; Tan et al., 2012), bloqueando o sinal da via apoptóticas (White, Howley, 2013). A ubiquitinação é a degradação proteossômica mediada pela adição de monômeros de ubiquitina, destinando a proteína à degradação (Cai et al., 2013)

A p53 é uma proteína supressora tumoral, codificada pelo gene *TP53*, capaz de regular a transcrição da p21, um importante inibidor de quinase dependente de ciclinas (Shamanna et al., 2012). Além do mais a oncoproteína E6 atua sob os *checkpoints* da divisão celular, estando associada à proliferação celular, ao mesmo tempo em que afeta o sistema de reparo, levando ao acúmulo de lesões no DNA (Liu, Baleja, 2008; Tan et al., 2012). De acordo com White e Howley (2013), a oncoproteína E6 apresenta um efeito epigenético, ligando-se ao complexo de acetiltransferases CBP-p300, que bloqueia a transcrição da p53.

A ORF E7 codifica uma proteína de 127 aminoácidos que interage com a proteína p600, também conhecida por UBR4, responsável pela sobrevivência celular e morfogênese (Demasi et al., 2007; Freitas et al., 2011; White, Howley, 2013). O complexo E7-p600 estimula a expressão de E6, levando à transformação celular (Demasi et al., 2007). Além do mais, a oncoproteína E7 degrada a proteína supressora tumoral pRb e interage com as CDKs p21^{waf1/cip1} e p27^{kip1}, resultando em transformação maligna (Duensing, Mürnger, 2002; White, Howley, 2013). A degradação da pRb leva a liberação do fator de transcrição E2F, que promove a entrada na fase S (síntese) interfásica e, portanto, da replicação celular e viral (White, Howley, 2013).

De acordo com Córtes-Gutiérrez et al. (2012) e Duensing e Mürnger (2002), as oncoproteínas E6 e E7 induzem anormalidades centroméricas, elevando o risco de segregação

cromossômica errônea e aneuploidias, além de estimular a replicação intensiva do DNA, favorecendo quebras do DNA que promovem a instabilidade genômica.

A instabilidade genômica é evidenciada por perda e ganho cromossômico, sendo frequentemente observada em tumores sólidos, sendo o primeiro evento que leva a transformação celular (Córtes-Gutiérrez et al., 2012; Duensing, Münger, 2002; Toledo, 2011). A ação combinada das oncoproteínas E5, E6 e E7, levando a instabilidade genética e a eventual transformação maligna é mostrada na figura 4.

Figura 4 – Ação combinada das oncoproteínas E5, E6 e E7.

A ação combinada das oncoproteínas E5, E6 e E7 promove a inibição da apoptose e o estímulo mitogênico. A ação clastogênica da E6 e E7 promove o acúmulo de mutações, levando a instabilidade genética e a eventual transformação maligna. Fonte: Modificado de Grce et al. (2013)

De acordo com Hobre et al. (2009) e You (2010), o controle epigenético do oncogene E6 se dá por sua ação inibitória sob o mediador de acetilação p300 na p53 e no núcleo das histonas nucleossomais, ao passo o E7 aumenta a acetilação de histonas do pRb e interage com as proteínas dos microtúbulos na mitose, resultando em defeitos do alinhamento dos cromossomos

durante a prometáfase. Além do mais, as oncoproteínas E6 e E7 promovem o aumento da expressão e da atividade da DNA metiltransferases (DNMT1) (Leonard et al., 2012).

Em resumo, os papilomavírus podem modular a atividade de E6 e E7 por meio da proteína E2, evitando a morte celular, garantindo o funcionamento da maquinaria necessária para expressão e replicação do DNA viral (Cai et al., 2013). A função resumida de cada uma das respectivas proteínas expressas pelo BPV é mostrada na tabela 1.

Tabela 1 – Resumo da função das proteínas codificadas pelo genoma do BPV

Proteína	Função
L1	- proteína maior do capsídeo viral, estabilização do capsídeo e ligação a peptídeoglicanos de superfície celular do hospedeiro (Fernandes et al., 2013; Góes et al., 2008; Roperto et al., 2008,).
L2	- proteína menor do capsídeo viral, controle da transcrição viral, replicação do DNA, segregação do genoma viral (Fernandes et al., 2013).
E1	- replicação viral, atuando como uma helicase dependente de ATP (Bian et al., 2007; Campos, 2011, Castella et al., 2006; Freitas et al., 2011; McBride et al., 2012).
E2	- replicação do DNA, manutenção do epissomo, modulação da resposta imune, transcrição viral, regulação gênica de E6 e E7 e empacotamento do DNA durante a montagem viral (Borzacchiello, 2007; Fernandes et al., 2013; Kurg et al., 2006; McBride et al., 2012; You, 2010).
E3	- sem função conhecida, presente na minoria dos PVs (Rivoite et al., 2006).
E4	- auxilia na penetração viral nas células basais, atua na perturbação da integridade da queratina, sendo responsável pelo efeito citopático (Doobar, 2013; Ferraro et al., 2011; Sousa et al., 2011).
E5	- proliferação celular a partir da dimerização com PDGF β , downregulation de MHC-I e II, evasão do sistema imune, ativação da via de sinalização de fator de crescimento epidermal (EGFR) (Borzacchiello et al., 2006; Borzacchiello, 2007; Hartt et al., 2011 Roperto et al., 2007; Talbert-Slagle, Dimaio, 2009; Tsai, Chen, 2003).
E6	- disrupção do citoesqueleto de actina, clastogênese, afeta sistema de reparo, proliferação celular e degradação proteossômica via ubiquitinação da p53 (Cai et al., 2013; Cheville, 2004 ^a ; Duensing, Münger, 2002; Liu, Baleja, 2008; Zhu et al., 2012).
E7	- transformação celular, degradação da proteína supressora tumoral pRb, desregulação do ciclo celular e tumorigênese (Demasi et al., 2007; Freitas et al., 2011).

2.3 A infecção pelo Papilomavírus bovino (BPV)

O BPV é endêmico em várias partes do mundo e sua dispersão pode se dar de forma direta (através do contato entre animais infectados) ou indireta (por meio de contato com áreas contaminadas por partículas virais, tais como ordenhadeira mecânica, bebedouro, comedouro, cordas e cercas) ou transmitido por insetos (Finlay et al., 2009; Love et al., 2012; Muro et al., 2008).

A infecção pelo BPV tem início a partir de uma micro-lesão tecidual, que expõe os peptídeoglicanos de sulfato de heparina que compõe a membrana plasmática (Hartt et al., 2011;

McBride et al., 2012; Shafiti-Keramati et al., 2003). A proteína L1 do BPV se liga ao sulfato de heparina, levando a uma mudança conformacional que expõe a proteína L2 que é clivada pela furina, resultando em uma segunda alteração estrutural, permitindo a ligação do vírus a integrina $\alpha 6$, de modo que as partículas virais são internalizadas através de endocitose, mediada por clatrina e caveolina (Hartt et al., 2011; McBride et al., 2012), cerca de 2-4 horas após a ligação do vírus à superfície da membrana celular (Fernandes et al., 2013) (figura 5).

Figura 5 – Modelo esquemático de infecção pelo papilomavírus

A) Proteína L1 do capsídeo viral se liga aos receptores de sulfato de heparina presente na membrana da célula hospedeira resultando em uma mudança conformacional, expondo a proteína L2 que é clivada pela furina, levando a uma segunda mudança conformacional que permite a ligação do vírus a integrina $\alpha 6$, levando a internalização do vírus. B) Partículas virais já ativadas podem se ligar diretamente a integrina $\alpha 6$, sem a participação da clivagem pela furina. Fonte: Modificado de Day e Schiller (2009).

Recentemente, estudos têm mostrado outras moléculas como participantes da infecção celular, sendo elas a laminina 5 ou 332, $\alpha 6$ integrina (CD49f) e fatores de crescimento (Florin et al., 2012; Yagui et al., 2006). A laminina 5 é uma integrina sintetizada por queratinócitos basais (Florin et al., 2012; Yagui et al., 2006).

A infecção pelo papilomavírus se inicia na camada basal do epitélio, nas células indiferenciadas, onde o genoma viral se mantém em baixo número de cópias e episomal (Campo, 1997; Liu, Baleja et al., 2008; McBride et al., 2012; Moody, Laimins, 2010). Após a infecção celular, o ciclo reprodutivo do BPV se dá com (1) a formação de genomas virais em baixo número de cópias, (2) a manutenção da replicação e (3) amplificação vegetativa em células diferenciadas (McBride et al., 2012). Assim sendo, o vírus só completa seu ciclo reprodutivo por meio de uma diferenciação concomitante das células epiteliais, o que resulta na ineficiência da propagação dos vírions em cultura de tecidos (Shafiti-Keramati et al., 2003; White, Howley, 2013). A figura 6 mostra de forma resumida a expressão diferencial das proteínas do BPV.

Figura 6 – Expressão diferencial das proteínas do BPV

Fonte: Modificado de Venutti et al. (2011)

A persistência viral e os mecanismos de evasão imune, conferidos pela redução da expressão do MCH-I e II e de receptores *Toll-like 9* pode manter a presença viral por longos períodos de tempo, com ou sem episódios agudos da doença, embora o animal seja um disseminador em potencial de partículas virais (Manglenon, Doobar, 2012).

No caso específico do BPV-2, este pode ser transmitido de forma vertical, uma vez que foi constatada que a placenta representa um sítio ativo para a infecção pelo vírus, que pode completar seu ciclo de vida no endométrio uterino e no epitélio coriônico (Roperto et al., 2007; Wosiacki et al., 2002). Além do mais, a atividade viral do BPV em sangue periférico vem sendo demonstrada a partir da observação do vírus em linfócitos CD4+ e CD8+, que por apresentarem sulfato de heparina na membrana celular são sítios de infecções (Hartt et al., 2011; Roperto et al., 2007). Publicações recentes mostraram, também, a atividade do BPV em sangue periférico por meio do ensaio cometa (Araldi et al., 2013) e RT-PCR (Silva et al., 2013). A figura 7 mostra a presença de BPV em diferentes tecidos, sugerindo o papel dos linfócitos como veículo disseminador de partículas virais.

Figura 7 – Identificação de BPV em outros tecidos

Identificação da proteína E5 de BPV-2 em linfócitos de sangue periférico (A) e epitélio coriônico de bovino através de IHQ (B), identificação de sequência L1 de BPV-2 em espermatozóide de animal infectado (C) e células sanguíneas em hemangioma uterino infectadas por BPV-1, 2 e 4 (D) através de hibridização *in situ*. Fonte: Modificado de Lindsay et al. (2009), Roperto et al. (2008), Roperto et al. (2012) e Yagui et al. (2009).

2.4 Aspectos clínicos e eventuais tentativas terapêuticas da Papilomatose bovina (PB)

A PB, também conhecida por figueira, verrucose, fibropapilomatose e epitelioma contagioso, é uma enfermidade infectocontagiosa tumoral benigna, que afeta, majoritariamente, o gado jovem, sendo causada por um agente etiológico viral (BPV) de natureza fibroepitelial que infecta células basais do epitélio, formando projeções digitiformes micro e macroscópicas, conforme mostrado na figura 8 (Lancaster, Olson, 1982; Monteiro et al., 2008; Turk et al., 2005). De acordo com Turk et al. (2005), os tumores frequentemente regredem espontaneamente, entretanto, podem persistir e, na presença de cofatores genéticos e/ou ambientais, podem progredir para um câncer.

Figura 8 – Papilomatose bovina observada em um animal de um ano, no qual se observa inúmeros papilomas cutâneos na região de cara e pescoço

Embora muitas vezes negligenciada por criadores e profissionais, a PB gera importantes prejuízos econômicos à pecuária, pois leva à queda da produção leiteira decorrente de quadros de mastites e obstrução dos tetos, observada, sobretudo, em fêmeas primíparas. Nestes casos, a higienização é complexa e interfere no fluxo do leite, podendo levar a sangramento do teto, dor na ordenha e dificuldade de encaixe da ordenhadeira mecânica (Monteiro et al., 2008; Muro et al., 2008).

A PB apresenta um potencial oncogênico, embora os mecanismos carcinogênicos do BPV não estejam totalmente elucidados, porém sabe-se que a malignização é um processo decorrente de anos ou décadas de acúmulo de mutações estocásticas induzidas (Liu, Baleja, 2008).

O tratamento da PB envolve diferentes procedimentos, tais como: (1) a excisão cirúrgica e cauterização dos sítios das lesões, que promove uma estimulação do sistema imune humoral, promovendo a queda espontânea de outros papilomas, porém a técnica mostra-se ineficiente em rebanhos de alta incidência da doença; (2) (auto)-hemoterapia, procedimento que consiste na retirada e aplicação imediata de sangue venoso, por via intramuscular profunda gerando um

estímulo no sistema imune inespecífico, levando à queda dos papilomas (Muro et al., 2008). Tais procedimentos não têm sido eficientes, o que é caracterizado pela incidência progressiva da doença. Até a presente data não há vacinas profiláticas e/ou terapêuticas disponíveis no mercado contra a PB.

2.5 A correlação entre a Hematúria Enzoótica Bovina (HEB), a ingestão de samambaia e o BPV na gênese de tumores malignos de bexiga e esôfago

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é clinicamente caracterizada por hemorragias intermitentes que conduzem à anemia e ao emagrecimento progressivo (Wosiack et al., 2012). Tal doença se caracteriza por lesões hemorrágicas e hiperplásicas da mucosa vesical que, frequentemente, evoluem para neoplasia, afetando bovinos entre três e cinco anos, sem preferência por raça (Wosiack et al., 2002).

De acordo com Wosiack et al. (2002) a HEB está associada a alterações nutricionais, como a falta ou excesso de molibdênio no solo, a ingestão de espécies vegetais *Pteridium aquilinum*, *P. esculentum*, *P. revolutum*, *Chelanthus seiberi*, *Encephalartos hilderbrandti*, *Ranunculus montana*, *R. acris*, *Climatis vitalba*, bem como pela bactéria *Corynebacterium renali* e fungo *Fusarium* spp.

A *Pteridium aquilinum* (figura 9A) é uma pteridófita pertencente à família *Dennstaedtiaceae*, cuja distribuição biogeográfica é observada em solos pobres, ácidos, com baixos níveis de cálcio e fósforo e umidade relativa elevada (Plessers et al., 2013; Wosiacki et al., 2002). A *P. aquilinum* é uma espécie frequentemente observada no sul do Estado do Espírito Santo, aonde a HEB é observada em 56,4% do rebanho bovino leiteiro, resultando em prejuízos econômicos (Dias et al., 2012).

A *P. aquilinum* possui compostos mutagênicos, carcinogênicos e imunossupressores que podem levar a neoplasia maligna de bexiga, que representa 0,01% das malignidades bovinas, acometendo animais adultos, sobretudo aqueles que habitam regiões montanhosas aonde a presença da samambaia é frequente (Dias et al., 2012; Maiolino et al., 2013; Roperto et al., 2010).

Entre estes compostos destacam-se: glicosídeos carcinogênicos como prunasina, quercetina (figura 9B), os ptaquilosídeos (figura 9C), o ácido shikímico e a tiaminase, enzima que atua na vitamina B1 (Borzacchiello, 2007; Plessers et al., 2013). Os sinais clínicos decorrentes da intoxicação crônica pela pteridófita envolvem: inapetência, anorexia,

emagrecimento progressivo, andar cambaleante, diarreia sanguinolenta, tosse, disfagia, regurgitação e halitose (Costa et al., 2011; Tobar et al., 2011).

Figura 9 – Samambaia *P. aquilinum* e suas substâncias carcinogênicas e imunossupressoras

Samambaia *P. aquilinum* (A), quercetina (B) e ptaquilosídeos, compostos carcinogênicos presentes na pteridófita (C). Fonte: Modificado de Pleser et al. (2013) e Velloso et al. (2009)

A possibilidade de o câncer ser ocasionado por agentes infecciosos é discutida há décadas, sendo que Amédée-Borrel, em 1903, foi o pioneiro a sugerir que tais agentes poderiam levar à transformação celular (Graner, 2000). Entretanto, somente em 1932 foi que Richard Shope descreveu o papilomavírus de coelhos como um agente carcinogênico viral (Graner, 2000; Shope, Hurst, 1933). Desde então, é conhecido o papel oncogênico dos PVs. Há diversos trabalhos na literatura que mostram que o BPV-2 está relacionado à co-carcinogenicidade e a etiologia da HEB (Dias et al., 2012; Stocco dos Santos et al., 1998; Roperto et al., 2007; Wosiacki et al., 2002). De acordo com Borzacchiello (2007) a proteína E5 do BPV-2 possui um papel de destaque na gênese do câncer urotelial, uma vez que a oncoproteína E5 leva ao aumento da expressão dos genes *ras* e da cicloxigenase-2 (COX-2), ao mesmo tempo em que acelera a atividade das telomerasas. De acordo com Roperto et al. (2010), a proteína E5 interage diretamente com o receptor de PDGF, levando a resposta mitogênica.

Diversos estudos apontam aberrações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico de bovinos infectados por BPV e que se alimentaram de *P. aquilinum* (Borzacchiello, 2007; Moura et al., 1988; Wosiacki et al., 2002). De acordo com Stocco dos Santos et al. (1998), apenas a infecção pelo BPV pode resultar em fragilidade cromossômica.

2.6 Aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos da Papilomatose bovina

A avaliação histopatológica da lesão representa um importante processo de avaliação, pois permite caracterizar tumores intraepiteliais associados a viroses com potencial oncogênico, tal como a ocasionada pelo BPV, sendo um método complementar a tipificação molecular por meio de PCR (Cascales et al., 2009; Leto et al., 2011; Monteiro et al., 2008; Turk et al., 2005).

Os papilomas representam neoplasias epiteliais que produzem projeções semelhantes a “dedos” a partir da superfície celular (Cheville, 2004). De acordo com Monteiro et al. (2008), as lesões são classificadas em: típicas, pedunculadas, atípicas, filamentosas e em “grão-de-arroz” (figura 10). Os papilomas pedunculados são de fácil disseminação, pois sangram facilmente e, consequentemente, infectam animais sadios através do contato direto com instalações, troncos, baias e mourões contaminados (Monteiro et al., 2008).

Figura 10 – Classificação dos papilomas

Fonte: Adaptado de Monteiro et al. (2008)

A análise histopatológica mostra, também, uma predileção por áreas anátomo-topográficas específicas relacionadas aos tipos virais (Monteiro et al., 2008). Entre os achados anatomopatológicos observados nas lesões papilomatosas observa-se a hiperplasia de células da camada espinhosa (acantose), hiperqueratose paraqueratótica, papilomatose e coilocitose (Anjos et al., 2010; Lancaster, Olson, 1982; Turk et al., 2005). Histopatologicamente, a papilomatose bovina cutânea é descrita como um efeito citopático viral, conhecido por coilocitose,

caracterizado por células vacuolizadas com núcleos fortemente basofílicos e picnóticos, envolto por um halo claro, estando associado à infecção pelo BPV (Leto et al., 2011).

A imunoistoquímica (IHQ) consiste em uma importante técnica que permite avaliar a presença de proteínas expressas pelo vírus, indicando a presença e atividade viral (Nakamura et al., 1997). A técnica consiste no emprego de anticorpos primários, capazes de se ligarem a epítomos alvos. Quanto à identificação do BPV através de IHQ há anticorpos monoclonais disponíveis no mercado, incluindo anti-L1, que permite a detecção da proteína maior do capsídeo viral, anti-E6, pouco empregado, pois apresenta inespecificidade de ligação, anti-E7, que permite a imuno-detecção da oncoproteína E7 e o anticorpo conjugado E1[^]E4, permitindo a marcação das proteínas precoces E1 e E2, associadas com a replicação viral.

2.7 O Diagnóstico do BPV

Os estudos envolvendo técnicas diagnósticas do BPV têm atraído grande interesse devido aos problemas decorrentes da infecção viral, tais como dermatites e câncer, que resultam em impactos econômicos significativos na pecuária industrial (Nascimento et al., 2012).

As técnicas diagnósticas consistem em exame clínico, análise histopatológica (Betiol et al., 2012) e detecção do DNA viral através de PCR, *Southern blot*, *Dot blot*, *Reverse blot* e hibridização *in situ* com sondas biotiniladas ou radiomarcadas (Del Fava et al., 2001; Leto et al., 2011). O emprego de anticorpos monoclonais contra epítomos de BPV também constitui uma técnica diagnóstica por meio de imunoistoquímica (Elzein et al., 1991).

Entretanto, a identificação e tipificação do BPV através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), empregando *primers* degenerados, seguido de purificação, sequenciamento e análise de similaridade de sequências através de programas computacionais e ferramentas virtuais como o BLAST, mostra-se o método mais sensível para a detecção viral (Borzacchiello et al., 2003; Carvalho et al., 2012; Ogawa et al., 2004; Jelínk, Tachezy, 2005; Leto et al., 2011; Monteiro et al., 2008; Nascimento et al., 2012; Zhu et al., 2012). O diagnóstico molecular pode, também, ser realizado por meio da técnica PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Carvalho et al., 2013).

O uso de *primers* específicos também tem sido empregado com êxito, porém não permite a detecção dos treze tipos descritos em uma mesma reação, bem como não é capaz de detectar supostos novos tipos virais. O uso de metodologias envolvendo *Nested PCR*, que envolve o uso de combinação de iniciadores, também não se revelou eficiente (Forslund et al., 1999).

2.8 Ensaio Cometa como Indicador de Atividade Viral

O Ensaio Cometa (EC), também conhecido por eletroforese em gel de célula única (SCGE – *Single Cell Gel Electrophoresis*) foi introduzido por Östling e Johanson em 1984 e posteriormente modificado por Singh et al. (1994), sendo considerado eficaz nos métodos citogenéticos (Flores, Yamaguchi, 2008).

O EC possui vantagens de ser uma técnica simples e versátil, pois, requer um pequeno número de células, podendo ser realizado com qualquer população celular eucariótica (Khoei et al., 2011). Além disso, o EC possui um grande espectro de detecção de danos no DNA, sendo um teste integrador e complementar a outros testes mutagênicos (Escobar, 2008), tendo seu protocolo padronizado no 4th *International Comet Assay Workshop* (Witte et al., 2007).

O EC é uma técnica amplamente aceita e utilizada nos estudos da genética toxicológica e médica, ecogenotoxicidade, para fins diagnósticos e de tratamentos médicos, biomonitoramento ambiental, estudo de células apoptóticas e reparo de DNA (Araldi et al., no prelo; Fabiani et al., 2012; Kassie et al., 2000, Khoei et al., 2011) cujo protocolo pode ser executado em menos de 24 horas (Olive et al., 2006). Recentemente o EC foi empregado como indicador de atividade viral em sangue periférico infectado com BPV (Araldi et al., 2013).

No teste, as células são englobadas por gel de agarose e espalhadas sobre a lâmina, sendo, então, submetidas a um campo elétrico que atua como uma força, promovendo a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras induzidas por mutágenos, adquirindo a aparência de um cometa (Araldi et al., 2013). A região nuclear origina a cabeça do cometa enquanto que os fragmentos, a cauda, cuja extensão está diretamente relacionada com a intensidade do dano (Olive et al., 2006).

2.9 Isolamento de vírions de BPV para estratégias vacinais

A purificação de vírus é essencial à obtenção de informações químicas, físicas, bioquímicas e biológicas das viroses para estudos sorológicos (Alli, Rossinck, 2007).

As primeiras vacinas para BPV foram baseadas em extratos obtidos a partir de macerados de verrugas (Olson, Skidmore, 1959; Kirnbauer et al., 1996; Shope, 1937) e, mais tarde, de vírus purificados (Jarrett et al., 1990¹ apud Kirnbauer et al., 1996).

¹ Jarrett WFH, O'Neil BV, Gaukroger JM, Laid HM, Smith KT, Campo MS. Studies on vaccination against papillomaviruses: a comparison of purified virus, tumor extract and transformed cells in prophylactic vaccination. Vet Rec. 1990; 126: 449-52.

A grande dificuldade enfrentada na pesquisa de estratégias vacinais para papilomavírus é o isolamento de um determinado tipo viral (Kirnbauer et al., 1996), haja visto que a co-infecção é frequentemente observada (Carvalho et al., 2012), associado à dificuldade de produção experimental de BPV (Favre et al., 1975; Kirnbauer et al., 1996). Além do mais, o sistema bovino desponta como um excelente modelo de estudos para o HPV, devido similaridades virais como a diversidade em tipo viral, homologia genética estrutural e potencial de progressão à malignidade (Jarrett et al., 1991).

A inexistência de um sistema de replicação viral *in vitro* dos PVs, em função da necessidade de diferenciação celular do epitélio para que haja a montagem e empacotamento das partículas virais (Meyers et al., 1992), justifica a necessidade de investimento em metodologias de isolamento viral.

Neste cenário, a tentativa de purificar vírions de BPV para a construção de vacinas vem gerando grande atenção (Hartt et al., 2011; Liu et al., 1997). Há diversas metodologias para a purificação de BPV baseadas em ultracentrifugação em gradientes de cloreto de cério (Baker et al., 1991; Buck et al., 2004; Bujard, 1967; Larsem et al., 1987; Waldeck et al., 1984) ou de sacarose (Favre et al., 1975; Liu et al., 1997). Entretanto, as técnicas de purificação de virions são laboriosas e englobam complicados procedimentos para a obtenção de quantidades de vírions suficientes para a formação de uma banda após a ultracentrifugação (Bujard, 1967; Wang et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O trabalho teve por objetivo isolar vírions de BPV, a partir de amostras de papilomas cutâneos, previamente submetidos à identificação e tipificação viral, através de PCR seguida de sequenciamento, empregando uma nova metodologia mais rápida e eficiente de isolamento viral.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar diagnóstico clínico e histopatológico das lesões coletadas nos diferentes animais afetados;
- realizar um estudo comparativo entre diferentes *primers* específicos e degenerados, a fim de se obter um sistema mais rápido e eficiente de diagnóstico molecular;
- identificar e tipificar vírus de BPV, através de PCR seguido de sequenciamento de DNA e análise bioinformática;
- avaliar a expressão das proteínas virais L1 (capsídeo) e da oncoproteína E7 nas diferentes camadas da epiderme, bem como na derme, através de imunoistoquímica;
- avaliar a ação clastogênica do BPV através do Ensaio Cometa para tecidos e comparar o potencial clastogênico dos tipos virais BPV-2, 5 e 9;
- isolar vírions de BPV, de acordo com o tipo viral, através de ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério, empregando uma metodologia adaptada;
- construir um Banco de BPV-2 do Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das Amostras de Tecido e Análise Histopatológica

Foram coletadas 77 amostras de papilomas cutâneos de 27 bovinos adultos (*Bos taurus*) da raça Simental, de ambos os sexos, com idade entre dois e cinco anos, provenientes da Fazenda Experimental. A escolha por esta propriedade consistiu no fato da mesma não apresentar a samambaia *P. aquilinum*, que poderia induzir danos no DNA, bem como pela distância em relação ao Laboratório de Genética, garantindo o transporte das amostras de modo a minimizar eventuais danos no tecido. Outro aspecto que tornou a fazenda elegível no trabalho foi à presença da raça Simental, sendo está destinada a produção leiteira, o que permite um melhor acompanhamento das lesões papilomatosas em função do tempo, uma vez que tais animais não são destinados ao abate.

O manejo do rebanho foi realizado de modo a minimizar o estresse, pois este pode levar a imunossupressão, favorecendo a perpetuação dos papilomas (Monteiro *et al.*, 2008). A metodologia empregada neste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal do Instituto Butantan (CEUA-IBU) (processo nº 1035/13).

As lesões foram coletadas por um médico veterinário, empregando cuidados assépticos, com iodo povidine e anestesia local (lidocaína 2%). As lesões foram devidamente identificadas, tendo sido registrado o local de remoção cirúrgica de acordo com a região anátomo-topográfica.

Uma amostra representativa de papiloma cutâneo de cada animal foi fragmentada em duas porções utilizando lâmina de bisturi estéril. Uma porção foi destinada a análise histopatológica, sendo fixada em solução de formalina tamponada a 10% em PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4). O material foi desidratado em concentração crescente de etanol, emblocado em parafina, submetido a cortes de 4-5 µm e corado com coloração de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular Axiophot (Carl Zeiss, Alemanha), com as objetivas de 5X, 10X, 20X e 40X e, as imagens foram capturadas através do *software* AxioVision versão 4.7.2. Como controle negativo para a análise histopatológica, foi empregado um fragmento de tecido cutâneo de um bezerro assintomático BPV-negativo.

A outra porção, assim como as demais lesões papilomatosas coletadas de cada animal, foi transportada para o Laboratório de Genética do Instituto Butantan em caixas térmicas e mantida a -20 °C, tendo sido destinada à identificação e tipificação molecular, ensaio cometa e isolamento viral.

4.2 Extração, quantificação e análise da qualidade do DNA

O DNA das amostras de papilomas foi extraído empregando-se o kit *Illustra™ Tissue & Cell GenomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare, Burckinghamshire, Reino Unido). Aproximadamente 25 mg de tecido foram fragmentados com o auxílio de lâminas de bisturi estéril. O material fragmentado foi transferido para tubos de polipropileno de 2 ml, acrescido de 1 ml de PBS estéril. Os tubos foram centrifugados por dois minutos a 16.000 g, em centrífuga refrigerada Mikro 22R (Hettich Holdin GmbH & Co., Kirchleugern, Alemanha), descartando-se o sobrenadante por aspiração. O *pellet* foi homogeneizado com 50 µl de PBS e centrifugado por 10 segundos a 2.000 g.

Na etapa de lise, foram adicionados 50 µl do tampão de lise tipo 1 e 10 µl de protease K, contidos no kit. Os tubos foram levados ao vórtex por 15 segundos e, posteriormente, incubados por duas horas a 56 °C no *Thermo Shaker TS-100* (Biossan, Brasov, Romênia). Após a incubação, os tubos foram centrifugados por 10 segundos a 2.000 g.

Na etapa de purificação, 500 µl do tampão de lise tipo 4 foram adicionados aos tubos, que foram vortexados por 15 segundos e, incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram transferidas para novos tubos de polipropileno contendo a coluna com a membrana de sílica, e submetidos à centrifugação por um minuto a 11.000 g, descartando-se o filtrado contido no tubo coletor.

Na etapa de lavagem e secagem, foram adicionados 500 µl do tampão de lise tipo 4. As amostras foram centrifugadas por um minuto a 11.000 g, descartando-se o filtrado. Foram adicionados 500 µl do tampão de lavagem tipo 6 as amostras, que foram centrifugadas por três minutos a 13.000 g, descartando-se o tubo de polipropileno.

A coluna foi transferida para um novo tubo de polipropileno de 1,5 ml, no qual foram adicionados 200 µl de tampão de eluição. Os tubos foram incubados por um minuto à temperatura ambiente e posteriormente, centrifugados por um minuto a 11.000 g. As amostras de DNA extraído foram mantidas a -20 °C até o momento de seu uso.

O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro BioPhotometer Plus (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), onde foi realizada a leitura de uma alíquota de 2 µl das respectivas amostras em comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm, calculando a concentração de em ng/µl, através da multiplicação do valor da absorbância pelo coeficiente de extinção, tendo sido determinada à razão A260/A280 e A260/A230 para avaliar a pureza do DNA obtido, onde valores inferiores a 1,7 indicam contaminação por proteínas e, superiores a 2,0, contaminação por RNA.

Após a quantificação do DNA, foi realizada a PCR empregando-se os *primers* para β -Globina bovina (*forward* 5' - AAC CTC TTT GTT CAC AAA GAG - 3' e *reverse* 5' – CAG ATG CTT AAC CCA CTG AGC – 3'), como controle de qualidade e integridade do material genético extraído (Yagui et al., 2008). A detecção da β -Globina em cada amostra revelou um amplicon de 450 pb, fornecendo uma indicação da qualidade apropriada do DNA (Freitas et al., 2007).

Parâmetros da PCR: Foram realizadas reações com um volume total de 25 μ l, sendo estas compostas por 19,0 μ l de PCR Master Mix (Quatro G, Porto Alegre) (100 mM de Tris-HCl, pH=8,5, 500 mM KCl, 1,7 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs e 1,5 U de Taq DNA Polimerase recombinante) 1 μ l do *primer forward*, 1 μ l do *primer reverse* e 4 μ l da amostra de DNA extraído em cada tubo de polipropileno. As reações foram levadas ao termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapura) e submetidas aos seguintes ciclos: uma fase inicial de três minutos a 94 °C, 35 ciclos com 50 segundos a 94 °C (desnaturação), 60 segundos a 60 °C (anelamento) e 60 segundos a 72 °C (extensão) e uma fase final de 5 minutos a 72 °C. Após o final das reações, estas foram acondicionadas a -20 °C.

Condições da eletroforese: Os produtos resultantes da PCR foram analisados em gel de agarose a 2%, em tampão TAE (Tris-acetato EDTA), corado com 1,0 μ l de GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) / 100 ml de solução de agarose. A corrida eletroforética foi realizada em cuba Horizon® 20.25 (Life Technologies™, Carlsbad, EUA) a 100 V, 400 mA, durante 120 minutos, tendo sido aplicado o marcador *100 pb DNA Ladder* (Invitrogen®, Carlsbad, EUA). O gel foi visualizado em transluminador MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalém, Israel) e as imagens foram capturadas através do *software* GelCapture versão 7.1 (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalém, Israel).

4.3 Obtenção dos genomas virais para teste de *primers* e controles positivos para PCR

Como controles positivos das PCRs, bem como para a realização do teste de *primers*, cópias de genomas virais de BPV-1 (AB626705), 2 (M20219.1), 3 (AF486184.1), 4 (X05817.1), 5 (NC004195.1) e 6 (AB845589.1) previamente clonados no vetor bacteriano pAT153. Estes vetores fazem parte do acervo biológico do Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

As bactérias competentes transformadas foram inoculadas *overnight* em meio Luria-Bertani (LB) acrescido de 50 μ g/ml de ampicilina, mantidas sob agitação de 250 rpm e temperatura de 37°C no *shaker* KS 400 *ic control* (IKA®-Werke GmbH Co., Alemanha) (Maniatis et al., 1982; Salvarasu et al., 2009). Após o crescimento *overnight*, uma alíquota de 850 μ l da cultura foi

transferida para tubos de criopreservação e acrescidos de 15% de glicerol estéril e conservados a -80 °C, mantendo-se um estoque destes controles (Maniatis et al., 1982).

O DNA plamidial foi extraído empregando-se o Kit *GeneJETTM Plasmid Miniprep* (Fermentas, Lituânia). Após a encubação, os tubos de Falcon foram centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi resuspendido em 250 µl do tampão de ressuspensão e levado ao vórtex. O material foi transferido para tubos de polipropileno de 2 ml, tendo sido adicionados 250 µl da solução de lise. Os tubos foram invertidos por seis vezes, cuidadosamente, conforme instruções do kit. Foram adicionados 350 µl da solução de neutralização e, os tubos foram novamente invertidos por seis vezes.

O material foi centrifugado a 13.000 rpm por cinco minutos e o sobrenadante foi transferido para as colunas, que foram novamente centrifugadas por um minuto a 11.000 rpm. O filtrado foi descartado e as colunas foram adicionados 500 µl da solução de lavagem. Os tubos foram centrifugados a 11.000 rpm por um minuto, descartando-se o filtrado. A etapa de lavagem foi repetida e as colunas foram transferidas para novos tubos de polipropileno de 1,5 ml, tendo sido adicionados 50 µl do tampão de eluição a 70 °C no centro das colunas. Os tubos foram centrifugados a 11.000 rpm por um minuto e o material eluído foi conservado a -20 °C.

4.4 Teste de *primers* para otimização de diagnóstico molecular

Devido à existência de um amplo conjunto de *primers* específicos e degenerados descritos na literatura empregados na identificação molecular do BPV, foi realizado um teste com os *primers* específicos para BPV-1 e BPV-2. A escolha pelos *primers* específicos para estes tipos virais se deu pelo fato destes serem os mais frequentemente observados no Brasil e por sua associação com a malignidade.

Foram avaliados, também, os iniciadores degenerados: FAP59/FAP64 - originalmente desenhados para detectar tipos de HPV (Forslund et al., 1999) e, posteriormente, empregados no diagnóstico viral de bovinos (Claus et al., 2009; Ogawa et al., 2004; Monteiro et al., 2008); MY09/MY11 (Nassir, Reid, 1999) – também empregado no diagnóstico de HPV; e os iniciadores *Delta-Epsilon* e *Xi* – desenhados pelo Laboratório de Genética do Instituto Butantan para se anelarem a vírus pertencentes aos gêneros *Delta* e *Epsilonpapillomavirus* e *Xipapillomavirus*, respectivamente. As sequências dos *primers*, bem como suas regiões-alvo no genoma e o tamanho esperado dos amplicons são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 – Sequências dos iniciadores específicos e degenerados empregados na identificação de BPV

Primer	Sequência (5'-3')	Gene alvo	Tamanho esperado de amplicon (pb)
BPV-1	GGAGCGCCTGCTAACTATAGGA ATCTGTTGTTTGGGTGGTGAC	L1	301
BPV-2	GTTATACCACCCAAAGAAGACCCT CTGGTTGCAACAGCTCTCTTTCTC	L2	164
FAP59/64	TAACWGTIGGICAYCCWTATT CCWATATCWVHCATITCICCATC	L1	480
MY11/09	GCMCAGGGWCATAAAYAATGG CGTCCMARRGGAWACTGATC	L1	450
<i>Delta-Epsilon</i>	CCAGAYTAYYTMAAAATGGC ATAAMKGCTAGCTTATATTC	L1	430
<i>Xi</i>	TWYAATAGDCCVTTTTGGAT TTMCGCCTACGCTTTGGCGC	L1	600

Nucleotídeos degenerados: W - A ou T, Y - C ou T, M - C ou A, R - A ou G, K - T ou G, V - A, C ou G, H - A, C ou T, D - C, G ou T, I - A, C ou T.

O objetivo de tal teste foi avaliar a eficiência de cada *primer* a fim de otimizar os diagnósticos. O teste foi realizado com cópias de genomas virais de BPV-1, 2, 3, 4, 5 e 6, previamente clonadas no vetor bacteriano pAT153, que fazem parte do acervo biológico do Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

Parâmetros da PCR: Foram realizadas reações com um volume total de 25 µl, sendo estas compostas por 21,0 µl de PCR Master Mix (Quatro G, Porto Alegre), 1 µl do *primer forward*, 1 µl do *reverse* e 2 µl da amostra de DNA extraído em cada tudo de polipropileno. As reações foram levadas ao termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapura). Os parâmetros referentes às reações empregando os diferentes pares de *primers* são mostrados na tabela 3. Para cada reação de PCR foi realizado um controle negativo, no qual não foi adicionado o DNA, para avaliar possíveis contaminações, haja visto que os produtos de reações de amplificação anteriores são fontes comuns de contaminação (Watson et al., 1997). A eletroforese foi realizada nas condições previamente descritas no item 4.2.

Tabela 3 – Parâmetros da reação de PCR empregando os diferentes pares de iniciadores

	BPV-1 e -2		FAP59/FAP64		MY09/MY11		Delta-Epsilon e Xi	
	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.	Tempo	Temp.
Início	3 min	94 °C	10 min	94 °C	4 min	94 °C	10 min	94 °C
Desnaturação	50 s	94 °C	90 s	94 °C	30 s	94 °C	60 s	94 °C
Anelamento	1 min	60 °C	90 s	50 °C	30 s	51,5 °C	60 s	52 °C
Extensão	1 min	72 °C	90 s	72 °C	30 s	72 °C	60 s	72 °C
	35 ciclos		45 ciclos		35 ciclos		35 ciclos	
Extensão final	5 min	72 °C	5 min	72 °C	7 min	72 °C	10 min	72 °C

4.5 Identificação e Tipagem Molecular de BPV

Com base nos resultados obtidos através do teste com os diferentes iniciadores, os *primers* degenerados *Delta-Epsilon* e *Xi* foram preferencialmente adotados para a identificação de sequências de BPV. Os *primers* se anelam e amplificam a ORF L1, a mais conservada entre os PVs e empregada com sucesso na identificação e tipagem de BPV. As amostras não amplificadas com estes pares de *primer* foram submetidas a novas reações empregando os iniciadores específicos para BPV-1 e 2.

Parâmetros da PCR: Foram realizadas reações com um volume total de 50 µl, sendo estas compostas por 36,0 µl de PCR Master Mix (Quatro G, Porto Alegre), 2 µl do *primer forward*, 2 µl do *reverse* e 10 µl da amostra de DNA extraído (concentração média de 100 ng/µl) em cada tubo de polipropileno de 0,2 ml. As reações foram levadas ao termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapura) e submetidas aos ciclos previamente descritos na tabela 3. Para cada reação de PCR foram realizados controles negativos, para avaliar possíveis contaminações e positivo, empregando cópias de genomas virais de BPVs, previamente clonados no vetor bacteriano pAT153. A eletroforese foi realizada conforme o item 4.2.

Purificação das bandas: As bandas obtidas foram recortadas sob transluminador e os amplicons foram purificados empregando-se o Kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen®, Carlsbad, EUA).

As bandas recortadas foram transferidas para tubos de polipropileno de 1,7 ml, tendo sido adicionados 1,2 ml do tampão de solubilização L3. Os tubos foram levados ao *Thermo Shaker* por 20 minutos a 56 °C. Após a solubilização do gel de agarose, o conteúdo dos tubos foi transferido para as colunas e submetido à centrifugação por 1 minuto a 12.000 g, descartando-se o filtrado. Foram adicionados 500 µl do tampão de lavagem W1. O material foi centrifugado por 1 minuto a 12.000 g, descartando-se o filtrado.

Os tubos foram centrifugados a 16.000 g por 2 minutos para a remoção do etanol. Na etapa de eluição, 50 µl do tampão de eluição E5 foram adicionados no centro das colunas, sendo incubados por 1 min a temperatura ambiente e, centrifugado por 1 minuto a 12.000 g. As amostras purificadas foram estocadas a -20 °C.

Sequenciamento: As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (CGH-USP), onde os 5 µl dos amplicons purificados foram submetidos à reação de sequenciamento no PRISM ABI 3730 DNA AnalyzerTM (Applied Biosystems, Singapura), empregando-se o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) e 2,5 µl do respectivo *primer* na concentração de 5 pM.

Análise de bioinformática: A qualidade das sequências de DNA foi verificada e a sobreposição de fragmentos foi montada usando o *software* de bioinformática BioEdit versão 7.0.9.0 (Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, EUA) . As sequências foram comparadas através de banco de dados do *National Center of Biotechnology* (NCBI), através da ferramenta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.gov>) (Müller, Willey, 2008; Zhang et al., 2000).

4.6 Imuno-deteção das Proteínas L1 e E7 em Amostras de Tecido Parafinado através de Imuno-histoquímica

Desparafinização: O material de tecido parafinado foi submetido a cortes de 3-4 µm, tendo sido fixado em lâminas silanizadas. Os cortes foram desparafinizados empregando dois banhos consecutivos de xilol 100% por 30 minutos, solução 1:1 xilol-álcool 100° por 30 minutos, dois banhos consecutivos de álcool 100° por 5 minutos, álcool 95° por 5 minutos, álcool 70° por 5 minutos, hidróxido de amônio 10% em álcool 95° por 10 minutos e quatro lavagens em água destilada por 5 minutos cada.

Recuperação Antigênica: As lâminas desparafinizadas foram imersas em tampão citrato, 0,01 M a 95 °C, permanecendo em banho-Maria nesta mesma temperatura por 35 minutos. O material foi retirado do banho-Maria, resfriado a temperatura ambiente por 30 minutos e, posteriormente, lavado com água destilada por 5 minutos por três vezes.

Imuno-deteção: O procedimento de marcação foi realizado de acordo com kit EnVisionTM + System HRP (AEC) (Dako®, Carpinteria, EUA) que permite uma melhor amplificação do sinal. A peroxidase endógena foi bloqueada com o *peroxidase block*, contido no kit, por 10 minutos. O material foi lavado com TBS (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,6) por 5 minutos por três vezes e tratado com Triton X-100 a 0,01% por 20 minutos. As lâminas foram

lavadas com TBS por 5 minutos e, bloqueadas com BSA a 5% por 40 minutos. Os cortes foram cobertos com um volume de 25-50 µl dos anticorpos monoclonais (mAb) anti-L1 e anti-E7 de HPV-16 (Abcam) na diluição de 1:100. As lâminas foram mantidas *overnight* a 4 °C em câmara úmida.

Após a incubação *overnight* com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com TBS-T (TBS, 0,2% de Tween-20) a 2% por duas vezes. Sob os cortes, foram aplicadas duas gotas do anticorpo secundário, conjugado com peroxidase (*peroxidase labelled polymer*), contido no kit. Em seguida, o material foi mantido por uma hora a 4°C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas com TBS-T por 5 minutos por três vezes e, tratadas com duas gotas do substrato cromógeno AEC por 15 minutos. O material foi lavado em água destilada por 5 minutos e contra corado com hematoxilina Mayer por 8 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada e mergulhadas hidróxido de amônio 0,037 M, para a remoção do excesso de hematoxilina. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada e montadas com o meio de montagem Faramount (Dako®, Carpinteria, EUA). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico binocular Axiophot (Carls Zeiss, Alemanha) com objetivas de 10X, 20X e 40X. As imagens foram capturadas através do *software* AxioVision versão 4.7.2.

Controles negativos: Foram empregados dois controles negativos, sendo eles: um fragmento de tecido cutâneo de um bezerro assintomático e BPV-negativo, compondo o controle negativo do experimento e, um fragmento de papiloma sem a adição do anticorpo primário, constituindo o controle negativo da reação.

4.7 Ensaio cometa de amostras de papilomas cutâneos

Preparo das lâminas: Lâminas de 26 X 76 mm Knittel® (Glasbearbeitungs GmbH, Alemanha) foram imersas em solução de Agarose NMP (*Normal Melting Point*) Top Vision™ (Fermentas, Vilnius, Lituânia) a 1,5%, diluída em tampão PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺ a 60 °C. As lâminas foram mantidas *overnight* em temperatura ambiente e, posteriormente acondicionadas a 4 °C até o momento de uso, que não excedeu 10 dias após o preparo das mesmas.

Preparo das amostras de tecido: Um fragmento das amostras de papilomas cutâneos foi transferido para tubos de criopreservação e acondicionado a -80 °C, pois a preservação a -20°C pode causar o cisalhamento físico do DNA devido à formação de cristais de gelo, induzindo danos no DNA (Azqueta, Collins, 2013). Aproximadamente 100 mg das amostras de papilomas cutâneos foram transferidos para tubos de polipropileno de 2 ml e, homogeneizados em 1 ml de HBSS - *Hanks' Balanced Salt Solution* – (5,4 mM KCl, 0,3 mM Na₂HPO₄, 0,4 mM

KH_2PO_4 , 4,2 mM NaHCO_3 , 1,3 mM CaCl_2 , 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,6 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 137 mM NaCl, 5,6 mM D-glicose, pH=7,4) (Gibco®, Carlsbad, EUA) a 4°C, acrescido de 20 mM de EDTA, 10% de DMSO e 5% de tripsina, empregando o homogeneizador mecânico Ultra 80 (Ultra Stirrer) a 8.000 rpm. Uma alíquota de 10 μl (10^4 células) do material homogeneizado foi transferida para tubos de polipropileno de 0,2 μl , tendo sido adicionados 75 μl de Agarose LMP (*Low Melting Point*) Top Vision™ LMP (Fermentas, Vilnius, Lituânia) a 0,75%, diluído em tampão PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} a 37°C.

O uso das respectivas concentrações de agarose NMP e LMP foi escolhido com base em Azqueta et al. (2011) e Langie et al. (2011), que mostraram que a concentração de agarose pode interferir no momento da cauda, reduzindo a porcentagem de DNA na mesma, à medida que se aumenta a concentração de agarose, de modo que a concentração ótima de LMA deve estar entre 0,6 e 0,8%. Desta forma, a concentração de LMA empregada atende ao valor ótimo proposto pelos autores.

Montagem das lâminas e lise: O volume final de 85 μl foi transferido para as lâminas pré-cobertas com agarose NMP a 1,5%. As lâminas foram cobertas com lamínula e mantidas por 20 min à 4 °C. Após este tempo, a lamínula foi retirada e as lâminas imersas em solução de lise (2,5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1,1% Triton X-100 e 11,2% DMSO) a 4 °C, por uma hora. A partir desta etapa, o trabalho foi realizado com as lâmpadas do laboratório apagadas para evitar a indução de danos no DNA. A solução de lise remove o citoplasma e proteínas nucleares (Collins et al., 2001).

Eletroforese: Após a lise, as lâminas foram lavadas com tampão PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} , dispostas em cuba horizontal de eletroforese e cobertas com solução tampão (NaOH e EDTA, pH>13,0), ficando expostas a 4 °C por 40 minutos. Durante esta etapa, ocorre o desenrolamento da fita dupla de DNA. Na sequência, foi realizada a corrida eletroforética com corrente de 25 V (0,86 V/cm) e 300 mA por 20 minutos, para promover a migração dos fragmentos de DNA livre do núcleo em direção ao ânodo. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram lavadas com tampão neutralizador (400 mM Tris-Cl, pH 7,5) por três vezes em intervalos de 5 minutos cada, com água destilada. As lâminas foram fixadas em etanol absoluto e mantidas na geladeira até a coloração, realizada com 20 μl de iodeto de propídeo (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Análise do material e estatística: O material foi analisado em microscópio de epifluorescência, equipado com filtro de excitação de 510-560 nm e barreira 590 nm, com aumento total de 400X. Foram analisadas 100 células por lâmina, as quais foram classificadas em classes de 0 (sem dano no DNA) a 4 (maior nível de dano) de acordo com o tamanho da cauda, conforme figura 11. As análises estatísticas foram realizadas com base nos escores,

obtidos a partir do somatório do produto do número de células observadas por classe, pelo respectivo valor da classe.

Figura 11 – Classificação dos nucleóides de acordo com o dano no DNA

Classificação visual dos nucleóides de acordo com o tamanho da cauda: 0 (ausência de danos no DNA), 1 (dano inicial), 2 (dano discreto), 3 (dano elevado), 4 (dano máximo). Fonte: Modificado de Comet Assay India Group, disponível em <http://www.cometassayindia.org/Scheme%20for%20visual%20scoring.pdf>

As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney, para a comparação entre os grupos controle (não infectado) e infectados e, por meio da Análise de Variância não paramétrica (ANOVA), através do Teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste *post-hoc* de Dunn, para a comparação do potencial clastogênico dos diferentes tipos virais identificados no presente trabalho. Os testes foram realizados com o *software* BioEstat versão 5.3, com nível de significância de 5%.

Controles negativos: Como controles negativos foram empregados fragmentos de tecido cutâneo de seis bezerros assintomáticos e não infectados pelo BPV, alocados sob as mesmas condições daqueles infectados.

4.8 Isolamento de Vírions de BPV para a Construção de Banco de Vírus

Após a identificação e tipificação molecular de BPV, 40 gramas de papilomas monovirais foram mecanicamente macerados por dois minutos com 320 ml de tampão de lise (1M NaCl, 0,02 M PBS pH 8,0). O produto foi transferido para tubos de nitrato de celulose de 36 ml e centrifugado por 30 minutos a 7.100 rpm em centrífuga Sorvall OTD-75, empregando o rotor *swinging* AH-629 (36 ml) a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para garrafas de polycarbonato de 250 ml Sorvall. Os *pellets* resultantes foram adicionados a 320 ml de tampão de lise e centrifugado novamente nas condições anteriores. Os sobrenadantes foram combinados e acrescidos de 0,25% de UltraPureTM SDS (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 0,01% de 1:250 tripsina (Sigma-Aldrich, St., Louis, EUA) / água MiliQ autoclavada. O volume final foi incubado por duas horas a 37 °C em *shaker* sob rotação de 250 rpm.

Após a incubação, o material foi centrifugado por uma hora a 23.600 rpm em rotor *swinging* Sorvall AH-629 (36 ml) em tubos de nitrato de celulose, tendo sido descartado o sobrenadante. O *pellet*, constituído majoritariamente por fibras colagenosas foi resuspendido em solução de colagenase 2 mg/ml em tampão de isolamento, obtendo-se um volume final de 5 ml. A suspensão foi incubada por 3 horas a 37 °C em *shaker* sob agitação de 300 rpm.

A suspensão foi centrifugada por uma hora a 29.100 rpm em rotor *swinging* Sorvall AH-650, em tubos de nitrato de celulose de 5 ml, tendo sido descartado o sobrenadante. O *pellet* foi resuspendido em 400 µl tampão de ressuspensão (0,05 M de NaCl, 0,01 M de EDTA, 0,05 M de PBS pH 7,4).

O volume de 400 µl da suspensão viral foi transferido para tubos de nitrato de celulose de 5 ml contendo 4 ml de solução de CsCL de densidade 1,3 g/ml em tampão de ressuspensão. Os tubos foram centrifugados por 24 horas a 34.000 rpm em rotor *swinging* Sorvall AH-650. Após a centrifugação, os vírions de BPV foram coletados por aspiração, com auxílio de agulha conforme figura 12.

Figura 12 – Esquema da coleta das partículas virais de BPV por aspiração após a ultracentrifugação

Fonte: Modificado de Maniatis et al., 1982.

Após a aspiração dos vírions, uma alíquota de 200 μ l foi transferida para um novo tubo de nitrato de celulose de 5 ml, tendo sido completado o volume do tubo com água destilada. O tubo foi centrifugado a 34.000 rpm, empregando-se o rotor *swinging* Sorvall AH-650 por 24 horas para concentrar o *pellet* de vírions. Após a centrifugação, o *pellet* foi coletado e transferido para tubos de polipropileno de 2 ml e fixado em tampão fixador de glutaraldeído a 2%. O material foi desidratado em séries graduais crescentes de etanol, submetido à coloração negativa e embocado em resina epóxi.

As telas foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão (M.E.T.) Leo 906E (Carls Zeiss, Alemanha) e as imagens foram capturadas com auxílio da câmera Mega View III e do *software* ITEM versão E 23082007 (Olympus Soft Imaging Solutions, Alemanha, GmbH), empregando uma voltagem de 80 kV e corrente constante de 1A em aumento de 60.000 a 120.000X.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste de *primers* específicos e degenerados na identificação de sequências de BPV

As técnicas de identificação e tipificação de BPV se resumem em avaliações clínicas e métodos moleculares, envolvendo o uso de iniciadores específicos (Araldi et al., 2013; Del Fava et al., 2001) ou degenerados, seguido de sequenciamento e alinhamento de sequências através de programas computacionais (Borzacchiello et al., 2003; Carvalho et al., 2012; Jelínk, Tachezy, 2005; Leto et al., 2011; Lunardi et al., 2013; Nascimento et al., 2012; Monteiro et al., 2008; Ogawa et al., 2004; Zhu et al., 2012) ou, ainda, através de PCR-RFLP (Carvalho et al., 2013).

Dado o número de diferentes *primers* já publicados, foi realizado um teste com dois iniciadores específicos para a identificação de BPV-1 e 2 e com quatro degenerados, sendo eles: FAP59/64 (Forslund et al., 1999), MY09/11 (Nasir, Reid, 1999), *Delta-Epsilon* e *Xi*, onde estes últimos foram desenhados pelo Laboratório de Genética do Instituto Butantan, a fim de se avaliar a sensibilidade de detecção de cada um dos respectivos *primers*. Os testes foram realizados empregando como molde genomas clonados dos três diferentes gêneros de PVs: *Deltapapillomavirus* (BPV-1 e 2), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5) e *Xipapillomavirus* (BPV-3, 4 e 6).

Os resultados confirmaram a especificidade dos *primers* para BPV-1 e 2, onde se observa a presença de um amplicon de 301 pb (figura 13A), na amostra de BPV-1, tal como esperado e um amplicon de 164 pb (figura 13B), na amostra de BPV-2. Os *primers* específicos não amplificaram genomas de outros tipos virais, mostrando-se seguros quanto a sua especificidade.

Figura 13 – Resultado do teste de *primers* com iniciadores específicos para BPV-1 e 2

Gel de eletroforese, mostrando amplicon de 301pb, originado a partir da PCR empregado *primer* específico para BPV-1 (A) e, amplicon de 164pb, empregado *primer* específico para BPV-2 (B). Controles negativos não revelaram produtos de amplificação, indicando ausência de contaminação.

Estudos mostram que os iniciadores específicos apresentam uma sensibilidade de identificação de sequências de BPV muito superior à observada com o emprego de *primers* degenerados (Vicari, 2011), permitindo, inclusive a detecção de sequências virais em sangue periférico (Araldi et al., 2013), o que pode ser justificado pelo desenho do *primer*, onde se busca manter a região 5' conservada, a fim de se assegurar o anelamento ao gene-alvo (Linhart, Shamir, 2002; Telenius et al., 1992).

Embora os *primers* específicos apresentem uma maior sensibilidade, eles não permitem a detecção dos 13 tipos virais de BPV de forma simultânea. Além do mais, o emprego de *primers* específicos inviabiliza a identificação e tipagem em face do elevado custo e tempo, além de não permitirem a identificação de supostos novos tipos virais, sendo uma desvantagem do uso dos mesmos frente ao uso de *primers* degenerados.

Estudos empregando a combinação de iniciadores específicos para diferentes tipos virais de forma simultânea (PCR *multiplex*), que poderia minimizar o tempo e custo na identificação e tipificação de BPV, também não se mostraram satisfatórios (Elnifro et al., 2000; Forslund et al., 1999; Vicari, 2011). Esta técnica, em face do tamanho semelhante dos amplicons, bem como

pelo aumento da temperatura de anelamento, ao mesmo tempo em que minimiza os artefatos de dímeros de *primers* promove um consecutivo aumento da estringência dos mesmos, pode levar a ineficiência da identificação viral (Elnifro et al., 2000; Yuryev, 2007).

O teste com o par de *primers* degenerado FAP59/64 foi capaz apenas de amplificar as amostras de BPV-3 e 6, conforme a figura 14A. A baixa sensibilidade de detecção do par de *primers* FAP59/64 pode ser justificada pela presença de duas bases inositol em ambas as sequências *forward* e *reverse* do iniciador, bem como pelo próprio desenho inicial, posto que o mesmo foi desenhado com base nas homologia de sequências do gene L1 de HPV (Forslund et al., 1999), o mais conservado do genoma dos PVs. Outras reações com o mesmo par de *primers* foram repetidas, tanto em genomas clonados de BPVs, quanto de amostras clínicas, obtendo-se resultados semelhantes. Problemas relacionados com a amplificação de sequências de BPV empregando o *primer* FAP59/64 foram também observadas por Silva et al. (2013), que obteve sucesso em 54% de um total de 72 amostras analisadas e Pessoa (2014), onde se constatou problemas com a identificação de HPV empregando o par de *primers*.

O par de *primers* MY09/11 não foi capaz de amplificar nenhuma das amostras controle (figura 14B). O iniciador, assim como o FAP59/64, foi desenhado com base nas sequências de HPV (Nasir, Reid, 1999), o que pode justificar sua baixa sensibilidade. Resultados semelhantes, usando o par de iniciadores MY09/11 foram observados por Martelli-Marzagão *et al.* (2010), onde 50% das amostras de *verruca vulgaris* analisadas pelos autores não amplificaram, e Pessoa (2014), mostrando que problemas semelhantes ocorrem não somente na identificação do BPV, bem como do HPV.

Uma série de parâmetros pode afetar o sucesso da PCR, incluindo: ciclagem, concentração de Mg^{2+} , pH, dNTPs, *primers* e a qualidade das amostras (Hecker, Roux, 1996). Os parâmetros de ciclagem foram realizados inicialmente de acordo com aqueles descritos em trabalhos prévios. Alterações na temperatura e tempo de anelamento não resultaram em resultados satisfatórios. As demais variáveis como concentração de magnésio e pH não foram ajustadas, pois as reações foram realizadas com Master Mix comercial. Além do mais, os trabalhos previamente publicados, que fazem uso desses mesmos *primers*, utilizaram *mix* comerciais. De acordo com Hecker e Roux (1996), o emprego de *mix* comerciais de PCR reduzem a variação entre as amostras e garantem a reprodutibilidade dos resultados.

Os *primers* *Delta-Epsilon* e *Xi* foram desenhados com base na homologia de sequências de BPV, sendo aplicados na identificação de vírus dos respectivos gêneros *Delta-Epsilonpapillomavirus* e *Xipapillomavirus*. Neste sentido, foi possível observar a especificidade dos respectivos iniciadores na detecção de gêneros, onde se constatou a presença de três

amplicons de 430pb, referentes às amostras de BPV-1, 2 e 5 (figura 13C) com o uso do *primer* *Delta-Épsilon* e, de três amplicons de 600pb, referentes às amostras de BPV-3, 4 e 6 (figura 14D), com o uso do *primer* *Xi*.

Figura 14 – Resultado do teste de *primers* empregando os iniciadores degenerados FAP59/64, MY09/11, *Delta-Epsilon* e *Xi*

Resultado da PCR empregando *primer* FAP59/64, mostrando dois amplicons de 480pb (A), gel mostrando ausência de amplificação com o uso do *primer* MY09/11 (B), resultado de PCR com *primer* *Delta-Épsilon*, mostrando amplicons de 430pb (C) e com *primer* *Xi*, revelando amplicons de 600pb (D).

Desta forma, os iniciadores *Delta-Epsilon* e *Xi* foram adotados preferencialmente na identificação de sequências virais nas amostras de papilomas cutâneos, uma vez que o

diagnóstico etiológico deve ser realizado no menor tempo possível e com o menor custo (Madoff; Kasper, 2013). Amostras que não amplificaram para estes *primers* foram submetidas a novas reações com os *primers* específicos.

Ainda que a identificação e tipificação de BPV baseada em metodologias baseadas em PCR apresentem uma série de aspectos que requerem o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas que permitam estudos epidemiológicos mais rápidos e com menor custo, elas constituem o único sistema de tipificação existente. Metodologias baseadas em imunodiagnóstico, tais como ELISA, mostram-se ineficientes para a identificação de BPV, seja pela inexistência de anticorpos antivirais contra as proteínas do capsídeo (L1 e L2) específicos para cada respectivo tipo viral, quanto pelo fato de que a cronificação da infecção leva a uma redução dos níveis de antígenos livres, resultando em uma consecutiva redução dos níveis de anticorpos (Crowther, 1995; Inglis et al., 2006).

Tal mecanismo deve-se a tolerância de linfócitos T e B, que se tornam não responsivos a antígenos, havendo uma falha na produção antigênica (Crowther, 1995). Além do mais, o ELISA não indica a presença de uma infecção ativa, mas sim a exposição do organismo ao antígeno analisado (Crowther, 1995).

Além do mais, no processo de desenvolvimento de produtos vacinais, o diagnóstico via PCR é fundamental para o conhecimento dos tipos virais circulantes, permitindo traçar um perfil dos tipos mais prevalentes, necessário para o desenvolvimento de vacinas multivalentes (Inglis et al., 2006).

Neste sentido, o uso de *primers* degenerados que se anelam na região consenso de L1, tais como os iniciadores *Delta-Epsilon* e *Xi*, permitiu a identificação de um grande número de novos supostos tipos de papilomavírus (De Villiers, 2013). Entretanto, sabe-se que é impossível desenhar *primers* que amplifiquem todos os tipos de PVs com igual sensibilidade e especificidade (De Villiers, 2013).

Em resumo, os *primers* para tipos específicos de BPV apresentam uma sensibilidade maior do que os degenerados, como já relatado em trabalhos anteriores (Silva et al., 2013), entretanto, eles não permitem a detecção de novos tipos virais. Dessa forma, implementar a PCR diagnóstica é fundamental na compreensão da diversidade viral, epidemiologia e a própria biologia dos BPVs.

5.2 Identificação e Tipagem de BPV

Foi observada uma elevada frequência de papilomatose cutânea bovina na população que compõe a Fazenda Experimental, sobretudo em animais jovens, com idade entre dois e três anos. Resultados semelhantes em animais da raça Simental foram observados por Turk et al. (2005). A alta incidência da PB está relacionada ao confinamento dos animais, já que populações confinadas são mais susceptíveis a surtos e a maior incidência da patologia (Muro et al., 2008).

A alta incidência de PB não é exclusiva da população estudada, uma vez que se estima que 60% do rebanho nacional esteja infectado com o BPV (Stocco dos Santos et al., 1998), embora esse número possa ser superior, pois o vírus pode ser assintomático (Araldi et al., 2013; Silva et al., 2013).

A manifestação sintomática, que leva ao surgimento de papilomas cutâneos, em animais jovens é bem descrita na literatura, tanto de BPV (Silva et al., 2013; Stocco dos Santos et al., 1998; Yagui et al., 2006), quanto de COPV, que causa a papilomatose oral canina (Bianchi et al., 2012; Fernandes et al., 2009).

Em relação à área anátomo-topográfica de remoção das lesões, foi observada uma maior predileção pela área nasal (54%), seguida pelo tórax (21%) e região dorsal (12%), conforme figura 15. Foi observada a presença de papilomas e fibropapilomas em áreas mais susceptíveis a traumatismos pelo contato direto com instalações, cercas, tronco, baias, comedouros e bebedouros. Dados semelhantes foram observados por Monteiro et al. (2008) e Özsoy, Özyildiz e Güzel (2011). As áreas de observação de papilomas cutâneos em bovinos são semelhantes àsquelas de sarcóides equinos, que também acometem animais jovens e na região inguinal, tórax-abdômen e cabeça (Nassir, Brandt, 2013). A área de localização anátomo-topográfica e o respectivo tipo viral identificado são mostrados no Apêndice A.

Figura 15 – Distribuição dos papilomas de acordo com a região anátomo-topográfica

Número (A) e frequência, em porcentagem, (B) de papilomas cutâneos observados por região anátomo-topográfica bovina.

A prevalência de lesões nestas regiões está relacionada à via de infecção do BPV, uma vez que o vírus requer uma microlesão tecidual, expondo os peptídeooglicanos de sulfato de heparina que compõem a membrana plasmática, que são os sítios de ligação da proteína L1 do capsídeo, iniciando o processo de internalização viral por endocitose, que ocorre cerca de duas a quatro horas após a ligação do vírus com a membrana de seu hospedeiro (Hartt et al., 2011; McBride et al., 2012; Shafiti-Keramati et al., 2003).

A prevalência de papilomas em áreas sujeitas a atritos sugere outra possível via de infecção dependente do sangue, isto porque após ocorrer uma micro-lesão tecidual, há uma infiltração leucocitária para os sítios lesionados, podendo carrear partículas de BPV.

Desta forma, o sangue atua não somente como reservatório viral como proposto por Stocco dos Santos et al. (1998), mas também como veículo disseminador viral. Trabalhos recentes mostraram a atividade do BPV em sangue periférico através de ensaio cometa (Araldi et al., 2013) e RT-PCR (Silva et al., 2013), sustentando o papel do sangue no estabelecimento da infecção. Outros indícios que permitem sugerir a ação disseminadora de vírus pelo sangue foram também observados na análise histopatológica do presente trabalho, por meio da transformação de fibroblastos, discutida no item 5.3.

A tipagem viral por sequenciamento requer o uso de *primers* eficientes que permitam a identificação de sequências virais. Nesse sentido, o conjunto de *primers* *Delta-Epsilon* e *Xi* mostraram-se mais eficientes do que o FAP59/54 e MY09/11, tendo sido preferencialmente adotados no presente trabalho.

Com o advento das tecnologias de sequenciamento, estas se tornam acessíveis a todos os laboratórios, fazendo dos dados moleculares uma valiosa fonte de informação biológica em todas as áreas, incluindo a medicina diagnóstica (Russo et al., 2012). É importante destacar que os bancos de dados genéticos como o GenBank vêm acumulando exponencialmente sequências depositadas, o que resulta em identidades iguais para sequências. Estas sequências, embora recebam nomes distintos, referem-se ao mesmo gene (Russo et al., 2012), por isso as comparações foram realizadas conferindo a matriz de identidade mais elevada com as sequências L1 dos genomas completos.

A tipagem revelou a presença de BPV-2 em 81,81% (63/77) das amostras, sendo o tipo mais prevalente na população estudada, seguida pelo BPV-5, observado em 11,68% (9/77), BPV-9, 3,89% (3/77) e BPV-3, observado em apenas uma amostra. Além destes tipos virais bem descritos, foi observada a presença do suposto novo tipo BR/UEL2 em uma amostra, apresentando uma matriz de identidade de 90% com a sequência L1. O alinhamento das sequências através do programa BLASTn é mostrado na figura 16.

Figura 16 – Alinhamento da sequência do suposto novo tipo viral identificado (BR/UEL-2)

Bovine papillomavirus isolate BPV/BR-UEL2 major capsid protein (L1) gene, partial cds

Sequence ID: [gb|EU293538.1](#) Length: 475 Number of Matches: 1

Range 1: 48 to 464 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
549 bits(608)	8e-153	375/418(90%)	3/418(0%)	Plus/Plus
Query 14	GTAGTGCCAA-GGTTTCTGGCAGCCA-TTCAGAGTGTITAGGATGAAATTTCTGACCCCT	71		
Sbjct 48	GTAGTGCCAAAGGTTTCTGGCAGTCAATTCAGAGTGTITCGAATGAAATTTCTGACCCA	107		
Query 72	AATAAATTCAGCTTTCAATCTCCCTCTGTATATAACCCTGATAATCAACGGTTAGTGTGG	131		
Sbjct 108	AATAAATTCAGCTTTCAATCTCCCTCTGTATATAACCCTGATAATCAGAGATTAGTGTGG	167		
Query 132	GCTGTACGGGGTATCGAAATATGTAGGGGCCAGCCTTTGGGAGTAGGAGTTACAGGGTAC	191		
Sbjct 168	GCTGTAAGAGGCATAGAAATATGTAGAGGACAACCTTTAGGAGTAGGTGTTACAGGGCAT	227		
Query 192	CCAGCATTTAATAAGTTTAGAGATGCTGAAATATAAATAGCAATTCTAATCAAGGGGAT	251		
Sbjct 228	CCAGCATTTAATAAGTTCAAGGATGCTGAAAACATAAATAGCAATTCTAATCAAGGGGAG	287		
Query 252	GATGATAGGGTTAATGTATGTGTAGACCCTAAGCAGGTGCAGCTATTTATTGTGGGTTGT	311		
Sbjct 288	GATGATAGGGTTAATGTATGTGTGGACCCCAAGCAAGTGCAGCCTTTTATTGTGGGCTGT	347		
Query 312	GTGCCATGCGATGGAGAGCATTGGGATGCAGCTACACCGTGCCCCACAGCAGAAACACAG	371		
Sbjct 348	GTACCATGTGATGGAGAGCACTGGGATAAAGCTACACCGTGCCCCACTGCAGACACACAG	407		
Query 372	CCCAGGAGACTGCCACCTATTGAGCTAAAAAACACTAAAATACAAGAAGGCGACATG	429		
Sbjct 408	-CCAGGAGATTGCCACCTATTGAGCTGAAAAAACACTAAAATTCAAGATGGGCGACATG	464		

A identificação do suposto novo tipo viral BR/UEL-2 chama a atenção para a diversidade de BPVs bem como por sua distribuição. O suposto novo tipo BR/UEL-2 foi identificado pela primeira vez por Lunardi (2008) no Estado do Paraná, tendo sido observado em papiloma cutâneo da região axilar. De acordo com Lunardi (2008), o vírus apresenta uma matriz de identidade de 78% com o BPV-4, permitindo classificá-lo como um *Xipapillomavirus*.

O suposto novo tipo foi identificado na região torácica de um animal de sexo feminino. Este achado mostra a distribuição do BPV, bem como de novos supostos tipos virais por diferentes áreas do Brasil, justificando a necessidade de investimento em estudos epidemiológicos mais amplos para conhecer os diferentes tipos virais circulantes no Brasil. Neste sentido, nosso laboratório tem identificado diferentes tipos e supostos novos tipos em território nacional (Araldi et al., prelo).

Além do mais, estudos mostram que, os PVs podem se manter latente, havendo um decréscimo da expressão de proteínas tardias, garantindo a manutenção do genoma na forma episomal ao mesmo tempo em que promove uma redução dos níveis de expressão do MHC-I e II ocasionada pela ação da oncoproteína E5, resultando na evasão do sistema imune uma vez que dificulta a apresentação antigênica (Demasi et al., 2005 e 2007; Fernandes *et al.*, 2009; Hartt et al., 2011; Mariz et al., 2013). Adicionalmente, o BPV causa danos à cromatina que podem gerar a instabilidade genômica, levando à malignidade (Araldi et al., 2013; Stocco dos Santos et al., 1998; Melo *et al.*, 2011), ao mesmo tempo em que o animal infectado torna-se um disseminador em potencial de vírions.

A co-infecção em cinco animais foi evento também verificado. Embora haja poucos estudos relatando a co-infecção, resultados semelhantes foram observados por Carvalho et al. (2012) e Araldi et al. (2013), abrindo uma ampla discussão no que diz respeito às estratégias vacinais. A co-infecção demanda a produção de vacinas de amplo espectro de cobertura, sobretudo para os tipos virais mais prevalentes (Campo, 1997; Nicholls, Stanley, 2000). Entretanto, não há estudos epidemiológicos concisos e de cobertura nacional que possam predizer os tipos virais mais recorrentes.

Embora tenha sido observada a presença de BPV-2 em 81,81 % da população estudada, a anamnese não revelou sinais clínicos de hematúria enzoótica crônica, sugestivo de carcinoma de bexiga, que estão associados ao vírus (Pathania et al., 2012; Roperto et al., 2010; Tan et al., 2012). Esse fato pode ser justificado pela ausência da samambaia *P. aquilinum* na propriedade. Estudos mostram que a ingestão de 10 g/Kg do animal da pteridófito levam à aplasia da medula óssea, acarretando em febre, diátese, hemorragia, trombocitopenia e neutropenia (Lucena et al., 2011) e, que na presença de BPV-2 pode progredir para o aparecimento de tumores na bexiga.

Embora não tenha sido observada a presença de sinais clínicos sugestivos de câncer de bexiga, a presença do vírus não deve ser negligenciada já que o BPV causa uma série de danos citogenéticos estocásticos que podem levar à instabilidade genômica, a qual está associada à carcinogênese (Araldi et al., 2013; Melo et al., 2011; Stocco dos Santos et al., 1998). Ao mesmo tempo em que o BPV leva a tais alterações, a oncoproteína E6 de seu genoma interage com os genes do sistema de reparo eucariótico impedindo a ação deste, amplificando mutações somáticas (Cheville, 2004; Grce et al., 2012).

Tendo em vista que a população bovina estudada é destinada também à produção leiteira, sinais clínicos de malignização podem surgir com a idade mais avançada dos bovinos. Estudos com HPV indicam que o tempo para a malignização pode ser de anos ou décadas após a infecção (Seiden, 2013). Tais dados são extremamente impactantes, pois as neoplasias representam uma parcela significativa das doenças que acometem o gado brasileiro, resultando em importantes prejuízos econômicos (Lucena et al., 2011).

5.3 Análise Histopatológica

A biópsia representa uma importante metodologia diagnóstica diferencial, embora os achados histopatológicos não sejam capazes por si só de confirmarem infecções virais, fazendo-se necessárias outras avaliações por meio de microscopia eletrônica de transmissão, marcadores imunológicos ou técnicas moleculares (Rivitti, 1983).

Embora seja sabido que os papilomavírus causam alterações morfológicas detectáveis em biópsias, estando relacionadas a um efeito citopático decorrente de infecções produtivas (Fernandes et al., 2009; Sousa et al., 2011), há poucos estudos histopatológicos acerca do BPV. Tais estudos buscam relacionar os tipos virais com os achados histológicos, o que justifica a necessidade desta análise. Além do mais a análise histopatológica associada aos resultados obtidos através de PCR conferem maior abrangência (Betiol et al., 2012).

O tecido normal é constituído pela epiderme, composta por epitélio estratificado e pela derme ou cório, que forma um denso estroma fibro-elástico, contendo estruturas vasculares, nervos e órgãos anexos (glândula sebácea e folículo piloso) (Rivitti, 1983). A epiderme é constituída pelas camadas: (1) germinativa ou basal, no qual se localizam os queratinócitos basais, dispostos perpendicularmente em relação à linha formada pela junção epiderme-derme, apresentando um citoplasma basofílico, núcleo grande e com alta atividade metabólica, (2) malpighiana ou espinhosa, constituída por células espinhosas com configuração poliédrica, (3)

granulosa, constituída por células contendo grânulos de cerato-hialina e (4) córnea, formado por células epidérmicas anucleadas (Rivitti, 1983).

A comparação da amostra de tecido coletado de um bezerro não infectado (figura 17A) em comparação com as amostras de papilomas cutâneos típicos (figura 17B) apresentou importantes diferenças morfológicas da epiderme e da derme. Além do mais, sabe-se que o BPV apresenta um controle de expressão gênica temporal, dependente da diferenciação celular, de modo que as células basais mantêm o vírus de forma latente, havendo uma maior quantidade de partículas virais na camada granulosa, com a liberação viral ocorrendo a partir da esfoliação das células da camada córnea (Fernandes et al., 2009). Além do mais, sabe-se que o BPV pode manter-se na camada basal, assim como em linfócitos, de forma assintomática, ou seja, sem gerar lesões papilomatosas (Campo, 2000). Por este motivo, amostra de tecido empregada como controle negativo foi submetida ao diagnóstico molecular e não revelou a presença de vírus.

Figura 17 – Análise histológica comparativa entre tecido normal e infectado por BPV

Fotomicrografia de tecido normal de bezerro não infectado, mostrando epiderme e derme com anexos (A) e amostra de papiloma cutâneo típico, com presença de acantose da camada espinhosa, apontado pela seta em branco, hiperqueratose, apontado pela seta em azul, hipergranulose, apontado pela seta amarela, e redução de anexos (B). Ambas as imagens obtidas com objetiva de 5X.

A análise microscópica dos fragmentos de formação cutânea, obtidos a partir de 27 bovinos, revelaram neoplasia exofítica com presença de acantose em 100% das amostras. A acantose corresponde à hiperplasia de células da camada espinhosa, havendo um aumento no número de desmossomos e tonofibrilas (Fernandes et al., 2009; Lancaster, Olson, 1982). A acantose é causada pela ação mitogênica combinada das proteínas E2, E5, E6 e E7 do BPV, uma vez que os PVs não expressam polimerases, fazendo necessária a indução da entrada na fase de

síntese interfásica da célula hospedeira, período no qual ocorre a replicação do DNA, disponibilizando polimerases para a replicação viral (Moody, Laimins, 2010).

A acantose leva a formação de papilas que invadem a derme (Campo, 2000), onde a E6 forma um complexo estável com a ubiquitina ligase celular (AP), resultando no complexo E6AP que promove a ubiquitinação da p53 – via de degradação proteossômica mediada pela adição de monômeros de ubiquitina que endereçam o peptídeo a ser degradado para o proteossoma 26 - (Cai et al., 2013; Pikart, 2001; White, 2013), enquanto que a E7 promove a fosforilação da proteína supressora tumoral pRb (Moody, Laimins, 2010; White, 2013).

A pRb encontra-se sob a forma hipofosforilada associada ao fator de transcrição E2F, formando o complexo pRb-E2F. O estímulo mitogênico, induzido por complexos de ciclinas e CDKs, leva à fosforilação do pRb e, consecutivamente, a disrupção do pRb-E2F, resultando na liberação do fator E2F, que promove a entrada na fase S e a replicação viral (Grce et al., 2012; Moody, Laimins, 2010; White, 2013).

Entretanto, a ligação da E7 a pRb pode inibir o crescimento celular e a apoptose. Porém, de modo a evitar tal inibição, que seria desvantajosa à replicação viral, a oncoproteína E6 realiza a degradação da p53, ao mesmo tempo em que se liga a duas acetiltransferases de histonas, a p300 e a CREB, bloqueando a acetilação da p53, estabelecendo um controle epigenético e uma redução da expressão da p53 (Moody, Laimins, 2010).

Dessa forma, as oncoproteínas E6 e E7 agem de forma orquestrada e, tal sinergismo é facilitado, pois elas encontram-se na mesma ORF, sendo seus genes transcritos como um único mRNA bicistrônico, apresentando um promotor comum, o P97 e um *enhancer* a montante do promotor, na região não codificante (NCR). Entretanto, E2 regula a expressão de E6 e E7 ao se ligar às sequências palindrômicas presentes em quatro sítios de ligação de E2 (E2BSs), presentes na NCR, incluindo o P97, atuando como repressor transcripcional (Cai et al., 2013; Ferraro, Canedo, 2011). A presença de um mRNA bicistrônico revela uma evolução do genoma viral, permitindo uma redução em termos de tamanho e gerando uma eficiência em termos replicativo (Mandigan et al., 2010).

A oncoproteína E5, liga-se ao receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*), localizado na membrana da célula infectada, levando à dimerização do mesmo receptor, o que resulta na transdução do sinal para o núcleo, estimulando a divisão e o crescimento celular (Johanson, Schwartz, 2013).

A E5 encontra-se associada ao complexo de Golgi e ao retículo endoplasmático, interagindo com a proteína Bap31, envolvida com o tráfico vesicular de MHC-I para a superfície celular, ao mesmo tempo em que promove a superexpressão de gangliosídeos de superfície

celular, impedindo o reconhecimento de células T, resultando em uma evasão do sistema imune (Grce et al., 2012).

Os resultados permitiram classificar 77,77% (21/27) das amostras como papilomas cutâneos (figura 18A) e 22,23% (6/27) como fibropapilomas (figura 18B), onde estes apresentaram BPV-2 e 5. Os fibropapilomas bovinos são lesões exofíticas, caracterizadas pela proliferação fibroblástica com margens irregulares, apresentando fibroblastos organizados em fascículos, com uma epiderme hiperplásica e hiperqueratótica, com presença de coilócitos na camada granulosa, podendo induzir à malignidade (Burnett et al., 1992; Cheville, Olson, 1964; Willians *et al.*, 2011).

Figura 18 – Análise histopatológica comparativa de papiloma e fibropapiloma

Fotomicrografia de papiloma cutâneo associado a BPV-9, mostrando proliferação fibroblástica (A) e fibropapiloma associado ao BPV-5, onde se observa a presença de fibroblastos organizados em fascículos, conforme indicado pelo seta (B). Imagens obtidas com objetiva de 10X.

Os fibropapilomas estão associados ao BPV-1, 2 (*Deltapapillomavirus*) e 5 (*Epsilonpapillomavirus*), sendo lesões também encontradas em infecções cruzadas por BPV-1 e 2 em zebras (*Equus burchelli*), cavalos, búfalos, lhamas, alpacas, burros, gatos domésticos, bem como por aquelas induzidas por papilomavírus ovino (OvPV-1 e 2) (Alberti et al., 2010; Campo, 1997; Challberg, 1989; Elzein et al., 1991; Schulman et al., 2003; Willians et al., 2011). A ausência de fibropapilomas induzidos por PVs do gênero *Xipapillomavirus* pode estar associado à ausência da ORF E6 nestes vírus (Campo, 1997).

Os fibropapilomas são semelhantes aos sarcóides equinos – neoplasias fibroblásticas localmente invasivas e não metastásicas, que até 1963 eram denominadas fibropapiloma equino (Löhr *et al.*, 2005; Lunardi *et al.*, 2013; Schulman et al., 2001). Nos últimos anos, tumores

semelhantes à sarcóides (fibropapilomas) têm sido relatados em outras espécies não equinas (Teifke et al., 2003).

A presença de coilócitos foi observada em 100% das amostras analisadas (figura 19). O termo coilócito foi introduzido por Koss e Durfee em 1956, em substituição ao termo célula balonizante, como sendo uma característica de condiloma acuminado (Fletcher, 1983; Rivitti, 1983). Os coilócitos são queratinócitos em degeneração destinados à morte celular ou à liberação do epitélio. São caracterizados pela presença de um halo proeminente, que não se cora com eosina ou ácido periódico de Schiff, apresentando núcleo acêntrico e picnótico, o que é um efeito citopático característico de infecções por PVs (Ferraro et al., 2011; Fletcher, 1983).

Figura 19 – Análise histopatológica de fragmento cutâneo de papiloma

Presença de coilócitos na camada espinhosa do epitélio (mostrado pela seta em verde) e célula apoptótica (evidenciado pela seta em branco).

A coilocitose é um achado histopatológico característico de infecções virais, não sendo capaz de gerar células malignas (Monte, Peixoto, 2010; Rivitti, 1983), sendo observado em papilomas de diferentes organismos, como cães (Bianchi et al., 2012) e seres humanos (Betiol et al., 2012; Ferraro et al., 2011; Fletcher, 1983; Rogovskyy et al., 2012). Alguns trabalhos

discutem a coilocitose como um marcador patognomônico para infecções por PVs (Betiol et al., 2012; Krawczy et al., 2008).

A coilocitose resulta da cooperação entre as oncoproteínas E5 e E6, sendo frequentemente observada nas camadas mais diferenciadas, onde é encontrada uma grande quantidade de partículas virais formadas (Krawczy et al., 2008). Embora as vias envolvidas na vacuolização perinuclear sejam desconhecidas, acredita-se que ela possa contribuir para a fragilidade dos queratinócitos, facilitando a liberação de partículas virais para o meio ambiente (Krawczy et al., 2008).

De acordo com Rashad e Evans (1967), papilomas com maior número de vírions apresentam um estrato córneo fragmentado, diferentemente de papilomas que apresentam uma menor quantidade de partículas virais apresentam uma maior homogeneidade do estrato córneo, com ausência de fibrilas fragmentadas. A análise histopatológica revelou a presença de papilomas com fragmentação do estrato córneo em 55,55% (15/27) das amostras.

As amostras apresentando fragmentação da camada córnea apresentam uma maior quantidade de partículas virais, de acordo com Rashad e Evans (1967). Tal observação se deve ao fato de que uma maior carga viral no tecido resulta em uma maior concentração de proteína E4. Esta oncoproteína causa alteração na integridade da queratina (Sousa et al., 2011). Essa observação torna-se relevante para os objetivos do trabalho, posto que papilomas com maior fragmentação de estrato córneo tornam-se preferíveis frente aos com menor carga viral no que diz respeito à escolha dessas amostras para o isolamento viral. Desta forma, a avaliação histopatológica torna-se uma valiosa ferramenta para o *screening* de amostras dedicadas ao isolamento viral através de ultracentrifugação em CsCl.

O estrato córneo apresentou hiperqueratose ortoqueratótica em 81,48% (22/27) e, hiperqueratose paraqueratótica em 48,14% (13/27) das amostras. A hiperqueratose paraqueratótica indica a hiperdiferenciação tecidual (Cheville, Olson, 1964; Sousa et al., 2011), sendo a principal hiperqueratose observada em infecções decorrentes de PVs (Fernandes et al., 2009; Martelli-Marzagão et al., 2010; Velazquez et al., 2012). De acordo com a *International Agency for Research Cancer* (IARC), a paraqueratose caracteriza-se pela queratinização anormal do epitélio escamoso, apresentando células escamosas, com citoplasma denso, eosinofílico (acidofílico) e um núcleo relativamente picnótico, estando associado a processos inflamatórios. De acordo com Rasahd e Evans (1967), a queratinização anormal é atribuída a ausências de fosfatases e oxidases.

A hipergranulose foi observada em 74,07% (20/27) dos papilomas cutâneos analisados. A presença de grânulos citoplasmáticos em células epidérmoides em diferenciação foi relatada pela

primeira vez em 1869 por Auffhamer e, descrita em 1873 por Langerhans na camada germinativa, porém, o termo cerato-hialina foi proposto por Waldeyer em 1882 (Matoltsy, Matoltsy, 1970). A hipergranulose se caracteriza por uma abundante quantidade de grânulos de cerato-hialina na camada granulosa, onde a presença de vírions já foi observada através de microscopia eletrônica de transmissão (Rashad, Evans, 1967), tendo sido observada, também, em papilomas de cães (Fernades et al., 2009), coelhos (Rashad, Evans, 1967) e humanos (Martelli-Marzagão et al., 2010). Os grânulos de cerato-hialina apresentam natureza protéica, sendo ricos em aminoácidos sulfurados. O grupo sulfidril (-SH) é responsável pela formação de ligações dissulfídicas, envolvidas no processo de queratinização (Jessen, 1970; Matoltsy, Matoltsy, 1970). De acordo com Ferraro et al. (2011), a hiperqueratose e a hipergranulose são responsáveis pela coloração branca-acinzentada característica dos papilomas.

A análise histopatológica revelou a presença de fibroblastos anaplásicos pleomórficos e marginais à camada basal (figura 20), sendo este um importante indício de transformação fibroblástica, tanto em amostras de papilomas quanto de fibropapilomas. Resultados semelhantes foram observados em fibropapilomas de girafas, onde foi constatada a presença de fibroblastos transformados e infectados por BPV, identificados através de RT-PCR, apresentavam núcleos “bizarros”, como proposto pelos autores (Willians et al., 2011), em sarcóides felinos, onde foi observada a presença de fibroblastos anisocarióticos (com alterações na morfologia nuclear) decorrentes de infecções por PVs (Teifke et al., 2003) e na camada subepitelial de fibropapilomas bovinos (Campo, 1997).

Figura 20 – Fotomicrografia de fibroblastos transformados

Fotomicrografia de cortes histológicos, observados em objetiva de 10X (A) e 20X (B), mostrando a presença de fibroblastos anaplásicos e pleomórficos marginais à camada basal.

Os *Deltapapillomavirus* afetam tanto o epitélio quanto o mesênquima (Roperto et al., 2012). De acordo com McBride et al. (2000), as oncoproteínas virais são responsáveis pela proliferação fibroblástica e pela transformação celular, de modo que fibroblastos transformados podem originar infecções produtivas no epitélio.

A redução dos níveis de expressão da ORF E2 resulta na superexpressão de E6 e E7, já que E2 atua como repressor ligando-se ao promotor P97 (Cai et al., 2013), levando à proliferação descontrolada de fibroblastos transformados (Willians et al., 2011). A oncoproteína E6 é capaz de se ligar a paxilina, resultando no fenótipo transformado (Moody, Laimins, 2010).

A regulação do ciclo celular de mamíferos é controlada pela ativação ordenada de cinases dependentes de ciclinas (CDKs). Em fibroblastos transformados pelas oncoproteínas de BPV ocorre a formação de rearranjos de complexos de ciclinas-CDKs e a degradação da p21, promovida pela ação da E6 (Xiong et al., 1993). A p21 é um inibidor universal de ciclinas de modo que sua degradação leva a um estímulo mitogênico (Fett-Conte, Salles, 2002; Xiong et al., 1993)

A oncoproteína E5, encontrada na membrana interna do retículo endoplasmático e do Complexo de Golgi, é responsável tanto pela evasão do sistema imune, através do sequestro de MHC-I (Tomita et al., 2007), quanto pela transformação celular *in vitro* e *in vivo* (Balcos et al., 2008; Löhr et al., 2005; Roperto et al., 2012). A oncoproteína E5 é capaz, também, de induzir transformação e maturação de queratinócitos (Burnett et al., 1992).

A presença de fibroblastos transformados em amostras de papilomas cutâneos reforça a existência de uma via de infecção interna, proposta por Araldi et al. (2013) na qual os linfócitos

não apenas atuam como sítio de latência viral, mas também como carreadores de vírus através da corrente sanguínea para sítios de infecção produtiva, que apresentem uma lesão tecidual. Desta forma, através de uma infiltração leucocitária, partículas virais poderiam atingir a derme e infectar os fibroblastos, onde a expressão as oncoproteínas E6 e E7 levariam à transformação celular.

Vários trabalhos sustentam tal hipótese, incluindo a presença de sequências de BPV em sangue periférico (Stocco dos Santos et al., 1998), detecção viral em linfócitos CD4+ e CD8+ (Roperto et al., 2011), células mononucleares (Wobeser et al., 2012). A infecção viral em linfócitos e fibroblastos é possível já que estes tipos celulares expressam sulfato de heparina, que representa o sítio de ligação da proteína L1 para internalização viral.

Desta forma, a regressão espontânea dos papilomas, que se caracteriza por uma massiva infiltração linfocitária na derme, com predomínio de linfócitos CD4+, $\gamma\delta$ (células T) e CD8+. (Campo, 1997), pode concomitantemente carrear partículas virais, incluindo de outros tipos virais para o sítio, repercutindo em uma recidiva do papiloma.

A presença de atividade viral de BPV em sangue periférico de bovinos assintomáticos também foi mostrada por Araldi et al. (2013) e Silva et al. (2013), embora os danos genotóxicos e clastogênicos decorrentes da ação viral sejam idênticos ao observado em animais afetados por papilomas (sintomáticos) (Araldi et al., 2013). A presença de BPV-1 e 2 já foi observada em fibroblastos de sarcóides equinos, na placenta e em animais recém-nascidos, sustentado essa nova via de infecção e sugerindo uma via de transmissão vertical (Nassir, Brandt, 2013; Roperto et al., 2012).

Os achados histopatológicos associados às infecções por BPV apresentam significado na compreensão dos mecanismos oncogênicos. Tendo em vista que as viroses estão associadas a 12% dos casos de cânceres (Gander, 2000; Jones et al., 2012). Além do mais, o BPV é um modelo no estudo do HPV, onde este é o agente etiológico de 5% de todos os casos letais de cânceres no mundo (Wang, Roden, 2013).

Poucos estudos têm contribuído para um melhor entendimento das vias de transmissão dos papilomavírus (Silva et al., 2013). Neste sentido, a análise histopatológica sugere uma nova via de infecção viral, já proposta por Araldi et al. (2013) e Silva et al. (2013), onde os linfócitos não somente atuam como reservatório viral, mas também apresentam atividade viral.

Os estudos sobre o BPV trouxeram importantes informações sobre os aspectos oncogênicos dos papilomavírus e, podem ser ampliadas aos estudos com HPV. Desta forma, as metodologias usadas neste trabalho são comparáveis àquelas empregadas nos estudos de HPV (Calinisan et al., 2002).

Além do mais, embora informações biológicas e patológicas acerca dos tipos mais frequentes de PVs continuem crescendo, há uma nítida falta de estudos envolvendo os tipos menos comuns (De Villiers, 2013). Dessa forma, os resultados observados através deste trabalho, associado com dados da literatura, sugerem uma nova via de infecção e apontam o risco carcinogênico dessas viroses.

5.4 Imunoistoquímica

A escolha por estes anticorpos anti-L1 e anti-E7 ocorreu em face destes serem monoclonais, reduzindo a probabilidade de ligações inespecíficas que poderiam induzir resultados falso-positivos. O emprego do mAb anti-L1 permite detectar a presença da proteína maior do capsídeo viral. Desta forma, uma vez detectada a marcação desta, pode-se sugerir a existência de infecção produtiva, pois pode ocorrer a montagem do capsídeo viral.

O emprego do mAb anti-E7 permite detectar a oncoproteína E7, associado a estimulação mitogênica, e apresenta a vantagem de identificar a presença viral dos três gêneros de papilomavírus, uma vez que a ORF E7 está presente nos diferentes gêneros de BPVs.

Com base nos resultados observados através da análise histopatológica, foi realizada a imuno-deteção, empregando anticorpos monoclonais anti-L1 e anti-E7 de HPV-16, uma vez que não há anticorpos monoclonais anti-BPV disponíveis no mercado. A marcação foi realizada em cinco lâminas representativas de cada um dos tipos virais identificados (BPV-2, 3, 5, 9 e BR/UEL2). A técnica de imunoistoquímica foi empregada preferencialmente em substituição à imunofluorescência, pois o material parafinado apresenta autofluorescência.

Os resultados da imunoistoquímica revelaram a marcação para ambos os anticorpos para os diferentes tipos virais. Como controles foram utilizados uma amostra de tecido normal de bezerro não infectado, que não revelou marcação e, uma amostra de papiloma BPV-2 positiva, na qual não foi aplicado o anticorpo primário, sendo este empregado como controle da reação, que também não revelou marcação. Desta forma, pode-se assegurar que as marcações observadas não representam eventuais artefatos da técnica.

Foi observada uma expressiva marcação de L1 na camada córnea (figura 21), como esperado, já que tal proteína é expressa nas camadas mais diferenciadas do epitélio, sendo uma proteína estrutural do capsídeo viral (Góes et al., 2008; Fernandes et al., 2013; Roberto et al., 2008). Entretanto, observou-se a marcação de células basais, próximas a fibroblastos transformados. Este dado sugere a expressão de L1 próximo ao estroma, podendo ser um indicativo de infecção produtiva em outras camadas. A literatura sustenta uma regulação da

expressão gênica temporal, associada à diferenciação de queratinócitos. Tal achado sugere a possibilidade de montagem viral em outros estratos, porém, em menor frequência se comparado à camada córnea.

Figura 21 – Marcação imunoistoquímica da proteína L1

Amostra de tecido de um bezerro não infectado por BPV, mostrando ausência de marcação, objetiva de 20X (A); controle negativo da reação, amostra de papiloma cutâneo, infectado por BPV-2, sem aplicação de anticorpo primário, objetiva de 10X (B); Amostra de papiloma infectado com BPV-2, revelando marcação para a proteína L1 na camada córnea como indicado pela seta, objetiva de 10X (C) e Marcação para Proteína L1 em amostra de papiloma infectado por BPV-9, mostrando presença da proteína estrutural na camada basal, próxima a fibroblastos transformados, evidenciada pela seta, objetiva de 20X (D).

A presença da proteína estrutural L1 de HPV já foi identificada em outros tecidos, através de imunoistoquímica, como, por exemplo, células da placenta (Roperto et al., 2013). Estudos apontam que células trofoblásticas e blastócitos são outros sítios de infecção para HPV-16, por expressarem integrinas $\alpha 6 \beta 4$, onde o vírus causa fragmentação do DNA, podendo levar ao aborto espontâneo (Calinisan et al., 2002).

Foi, também, observada uma expressiva marcação de E7 em todas as camadas do epitélio (figura 22), com uma maior concentração na camada granulosa. Estes dados estão de acordo com a literatura, pois a oncoproteína E7 promove a degradação da proteína pRb, liberando o fator E2F (Demasi et al., 2007; Freitas et al., 2011; Venutti et al., 2011; White, Howley, 2013). Isto promove a entrada na fase de síntese interfásica, garantindo a disponibilidade de polimerases à replicação viral, ao mesmo tempo em que o estímulo mitogênico leva à acantose, relatada nos achados histopatológicos. A presença de E7 no estroma pode, juntamente com E5 e E6 já relatada em trabalhos prévios (White, Howley, 2013), ser responsável pelo fenótipo transformado dos fibroblastos, identificados através da histopatologia.

A associação da análise histopatológica a imunoistoquímica mostrou-se útil, trazendo importantes indícios de outros sítios de atividade viral, o que eleva a complexidade dos estudos que tangem os aspectos oncogênicos dos papilomavírus. Ao mesmo tempo, tais dados enfatizam a necessidade em investir em estudos de pesquisa básica.

Figura 22 – Marcação imunoistoquímica da oncoproteína E7

Controle negativo, amostra de papiloma infectado por BPV-2, sem anticorpo primário, revelando ausência de marcação, objetiva de 10X (A); marcação da oncoproteína E7, indicada pela seta, nas camadas espinhosa, e granulosa, com elevada marcação nesta, objetiva de 20X (B e C) e marcação de E7, apontada pela seta, em estroma conjuntivo, indicando atividade viral na derme, objetiva de 20X (D).

5.5 Ensaio Cometa

Desde meados da década de 1930, sabe-se que mutações gênicas e/ou cromossômicas estão associadas a processos oncogênicos (Graner, 2000). Outros vírus, que não pertencentes à família *Papillomaviridae* apresentam ação mutagênica comprovada, tal como o Epstein-Barr Vírus (EBV), que promove inversão cromossômica e o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), resultando em translocações e mutações do gene p53 (Graner, 2000).

A participação das viroses na etiogênese dos processos carcinogênicos foi primeiramente proposta por Amédée Borrel em 1903 (Graner, 2000). Entretanto, o papel oncogênico das viroses foi comprovado por Richard Shope em 1932, que descreveu a ação indutora de tumores em mamíferos de um filtrado de vírus (Graner, 2000).

De acordo com Wang e Kieff (2013), para que um vírus seja considerado oncogênico, deve-se levar em consideração os seguintes critérios: (1) dados epidemiológicos, (2) presença de

DNA viral em amostras tumorais, (3) capacidade transformante do vírus em células de cultura, (4) resultados de ensaios *in vitro* que evidenciem atividade mutagênica, (5) dados patológicos que evidenciem papel transformante *in vivo* e (6) capacidade de reduzir os índices de neoplasias malignas por meio de vacinação.

Embora Zur Hausen já tenha demonstrado o papel oncogênico do HPV (Zur Hausen, 1999) e a *World Health Organization* tenha reconhecido o HPV-16 e 18 como carcinógenos humanos em 1995 (Borzacchiello, 2013; Campo, 1997, 2002; De Villiers, 2013), a associação de técnicas executadas no presente trabalho corrobora o papel oncogênico do BPV, seguindo todos os critérios estabelecidos por Wang e Kieff (2013).

Há uma vasta literatura que mostra a participação do BPV na etiologia do câncer de bexiga e do trato digestório superior (Campo, 1997; Stocco dos Santos et al., 1998; Roperto et al., 2012) bem como que mostram a presença de DNA viral tanto em amostras de neoplasias malignas em bovinos, quanto em sarcóides equinos associados ao BPV-1, 2 e 13 (Hart et al., 2011; Potocki et al., 2013; Shulman et al., 2003). A transformação *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos infectados por BPV também já foi extensamente reportada (Burnett et al., 1992; Campo, 1997; Tomita et al., 2007).

A ação transformante *in vivo* do BPV foi observada na análise histopatológica do presente trabalho, bem como reportada em trabalhos prévios, tanto com fibropapilomas, como sarcóides positivos à presença de BPV (Campo, 1997; Teifke et al., 2003; Willians et al., 2011).

A fim de avaliar a ação clastogênica do BPV, como indicativo de atividade viral e de corroborar seu papel oncogênico acordo com os critérios já descritos, foi realizado o ensaio cometa de amostras de papilomas cutâneos.

O ensaio cometa é uma técnica útil empregada em testes de genética toxicológica (Azqueta, Collins, 2013; Godschalk et al., 2013), tendo sido empregado recentemente como indicador de atividade viral de BPV em amostras de sangue periférico (Araldi et al., 2013). O ensaio requer células isoladas a fresco ou criopreservadas, as quais são homogeneizadas com agarose e submetidas a um campo eletroforético, que promove a migração de segmentos de DNA, originados a partir de quebras simples ou duplas (Azqueta, Collins, 2013; Godschalk et al., 2013).

Entre as muitas vantagens do ensaio, encontra-se sua rapidez, baixo custo e elevada sensibilidade, por se tratar de um método molecular de detecção de clastogenicidade e a possibilidade de ser empregado em diferentes tecidos (Azqueta, Collins, 2013; Brendler-Schwaab et al., 2005; Godschalk et al., 2013; McKelvy-Martin et al., 1993).

Uma importante contribuição do ensaio cometa *in situ* consiste em avaliar a clastogenicidade induzida por um mutágeno em um sítio específico (Miyamae et al., 1998; Navarrete et al., 1997), o que, aplicado ao contexto dos PVs, permite uma maior compreensão do papel dos oncogenes virais no estabelecimento de um microambiente tumoral.

Com base nos valores dos escores observados entre as amostras de seis bezerros não infectados (controle negativo) e infectados pelo BPV (tabela 4), foi realizado o teste de Mann-Whitney para duas amostras independentes, com nível de significância de 5%.

O teste revelou diferenças estatísticas significativas entre animais infectados e não infectados ($U=0,000$, $Z(U)=3,600$, $p=0,0002$), revelando que a presença viral induz efeitos clastogênicos em nível tecidual. Para comparar a ação genotóxica dos tipos virais identificados nas amostras submetidas ao ensaio cometa, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) não paramétrica (teste de Kruskal-Wallis), seguida do teste *post-hoc* de Dunn, ambos com nível de significância de 5%. O teste não incluiu as amostras infectadas com BPV-3 e com o suposto novo tipo viral BR/UEL2, pois para fins de comparação estatística, se requer um número amostral superior a três.

O teste de Kruskal-Wallis revelou diferenças estatísticas significativas entre os animais infectados e não infectados ($H=17,4326$, $p=0,0006$) como já constatado anteriormente pelo teste de Mann-Whitney, porém não revelou diferenças significativas entre os tipos virais (tabela 5). Estes dados permitem assegurar que o BPV-2, 5 e 9 apresentam ação comparativa sobre a cromatina hospedeira.

Tabela 4 – Número de cometas observados por classe

Controles	0	1	2	3	4	Score
1	89	7	1	2	1	19
2	76	7	7	9	1	52
3	74	12	1	11	2	55
4	90	5	3	2	0	17
5	87	5	1	5	2	30
6	86	10	2	1	1	21
Total	502	46	15	30	7	194
Tipo viral	0	1	2	3	4	Score
BR/UEL2	2	0	2	19	77	369
BPV-2	5	0	0	20	75	360
BPV-2	16	6	10	22	46	270
BPV-2	4	7	17	29	43	300
BPV-2	10	31	4	15	40	244
BPV-2	16	0	1	10	73	324
BPV-3	3	2	2	12	81	366
BPV-5	0	0	6	10	84	378
BPV-5	2	1	4	12	81	369
BPV-5	1	1	5	15	78	368
BPV-5	0	1	8	9	82	372
BPV-5	0	1	9	16	74	363
BPV-5	0	0	1	10	89	388
BPV-5	0	0	10	7	83	373
BPV-5	0	0	7	14	79	372
BPV-9	0	0	0	11	89	389
BPV-9	0	3	0	5	92	386
BPV-9	3	4	7	5	81	357
Total	62	57	93	241	1347	6348

Número de nucleóides observados por classe de 0 (sem dano) a 4 (dano máximo), em um total de 100 células analisadas, seguido do valor de escore.

Tabela 5 – Resultado do teste *post-hoc* de Dunn, revelando diferenças estatísticas significativas entre animais infectados e não infectados (controles).

Não infectados (controles)	Animais infectados		
	BPV-2	BPV-5	BPV-9
19 ^{a*}	360 ^b	378 ^b	389 ^b
52 ^a	270 ^b	369 ^b	386 ^b
55 ^a	300 ^b	368 ^b	357 ^b
17 ^a	244 ^b	372 ^b	-
30 ^a	324 ^b	363 ^b	-
21 ^a	-	388 ^b	-
-	-	373 ^b	-
-	-	372 ^b	-

*Valores seguidos de letras iguais indicam ausência de valores estatísticos significativos.

A ação clastogênica detectada está associada à presença viral, posto que o material foi conservado a -80°C, conforme proposto por Azqueta e Collins (2013), a fim de evitar eventuais danos causados pelo cisalhamento físico do DNA decorrente da formação de cristais de gelo. De acordo com Miyamae et al. (1998) e Hartmann et al. (2003), nenhuma forma de dissociação celular, seja por meio mecânico ou enzimático, está associada a eventuais danos no DNA capaz de induzir resultados falso-positivos.

O controle negativo, em se tratando de bezerros assintomáticos não infectados por BPV e, expostos às mesmas condições ambientais dos animais infectados permite indicar que os danos ao DNA evidenciados pelo ensaio cometa são decorrentes da infecção viral. Além do mais, a coleta das amostras teve o cuidado de não selecionar amostras provenientes de animais que estivessem fazendo uso de antibióticos, já que se sabe que o uso destes eleva o potencial clastogênico. Além do mais, amostras com sinais de processos infecciosos ou ferimentos que pudessem permitir a infecção por agentes oportunistas também foram inseridas nos critérios de exclusão de coleta a fim de reduzir resultados falso-positivos.

Além do mais, a contagem e classificação visual dos cometas aumentam a estridência e fidedignidade dos resultados em relação a métodos de contagem que empregam *softwares* (Azqueta, Collins, 2013). De acordo com os mesmos autores, os métodos de análise manual são preferencialmente elegíveis frente aos métodos automatizados, pois estes podem excluir da contagem as células altamente danificadas, bem como pode não conseguir identificar a sobreposição de cometas.

Além do elevado número de cometas de classe 4 (figura 23), foram evidenciadas diversas figuras de cometas *hedgehog*, caracterizados por uma cabeça pequena, ou mesmo ausente e uma longa cauda, indicando uma elevada fragmentação do DNA, decorrente de quebras simples e duplas. A visualização de tais cometas só foi possível devido ao sistema de análise manual, já que sistemas automatizados classificam a cabeça de forma isolada, classificando-a em classe 0 (ausências de danos), sendo esta mais uma desvantagem do uso de *softwares* (Azqueta, Collins, 2013).

Figura 23 – Imagens de cometas sem dano e com dano máximo

Imagem de cometas de classe 0, indicando ausência de danos no DNA, observado em tecido normal de bezerro não infectado pelo BPV (A) e cometa de classe 4, indicando maior nível clastogênico, decorrente da ação viral, observado em tecido de animal jovem infectado por BPV-2 (B).

A presença de cometas *hedgehogs* indica células no início do processo de apoptose (Azqueta, Collins, 2013; Brendler-Schwaab et al., 2005; Hartmann et al., 2003) indicando, portanto, um possível efeito citotóxico decorrente da ação viral. Tais cometas podem ter sido originados a partir de coilócitos, que são células destinadas à apoptose.

A presença de células apoptóticas foi também observada na análise histopatológica. A apoptose é um evento esperado nas camadas mais estratificadas do epitélio, uma vez que nestas os vírus completam seu ciclo lítico e resultam na liberação de partículas virais para o meio ambiente.

A ação genotóxica do BPV em sangue periférico empregando o ensaio cometa já foi demonstrada em trabalho anterior (Araldi et al., 2013). Resultados semelhantes, obtidos através do ensaio cometa, foram obtidos a partir de fibroblastos de sarcóides equinos revelando um expressivo efeito genotóxico decorrente do BPV (Potocki et al., 2013).

Entretanto, as lesões analisadas no presente trabalho, consistem em lesões benignas (papilomas), configurando o primeiro estudo genotóxico do BPV empregando o ensaio cometa. Os resultados mostraram que os BPVs-2, 5 e 9 apresentam o mesmo nível mutagênico.

A clastogenicidade observada pode estar associada à ação combinada das oncoproteínas E5, E6 e E7, onde a E5 é responsável pela evasão do sistema imune, garantindo a persistência da infecção viral (Grce et al., 2012), ao mesmo tempo em que pode induzir a transformação tanto de queratinócitos quanto de fibroblastos (Burnett et al., 1992). A oncoproteína E6 promove a degradação proteossômica da p53, onde esta é ativada em resposta a sinais de danos celulares, causando instabilidade cromossômica, mudanças no padrão de metilação do DNA e estresse

oxidativo, gerando o acúmulo de danos no DNA (Fett-Conte, Salles, 2002; Longo, 2013; Potocki et al., 2013).

A oncoproteína E7 forma um complexo com a p600, estimulando a expressão de E6, levando a transformação celular (Demasi et al., 2007; Freitas et al., 2011; White, Howley, 2013). Além do mais, a oncoproteína E7 degrada a proteína supressora tumoral pRb, resultando em desregulação do ciclo celular e neoplasias (Duensing, Mûnger, 2002; White, Howley, 2013).

Estudos apontam, também, o papel modulador das oncoproteínas virais em relação à síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) (Potocki et al., 2013; Schwartz, 1996). As oncoproteínas de vírus de DNA podem atuar no balanço pró-/antioxidantes da célula hospedeira, através do aumento na produção de metais ou óxido nítrico (pró-oxidantes) ou inibindo a síntese de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, afetando o balanço *redox* da célula hospedeira, elevando os danos à cromatina (Schwartz, 1996) como, por exemplo, a clastogenicidade observada nas amostras de papilomas cutâneos.

Os danos induzidos pelo BPV podem levar a carcinogênese, já que as neoplasias resultam de mudanças pleiotrópicas do estado celular, decorrente do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que desorganizam eventos celulares normais (Fett-Conte, Salles, 2002; Miyamae et al., 1998).

De acordo com Potocki et al. (2013) foi observada uma redução em 20% no potencial de membrana mitocondrial de fibroblastos infectados por BPV, levando a uma queda expressiva na produção intracelular de ATP, indicando a ativação da glicólise anaeróbia (Efeito Warburg), comprovando o papel da infecção viral no estabelecimento do microambiente tumoral. Desta forma, o vírus não somente induz alterações genéticas nas células hospedeiras como também cria um microambiente favorável à malignização.

Após a malignização, as oncoproteínas virais ativam vias de Ras e NFκB, estimulando a produção de ROS, que no estroma tumoral promovem o aumento da expressão de transportadores de membrana MCT4 em fibroblastos, que exportam L-lactato e corpos cetônicos para as células epiteliais cancerígenas, as quais direcionam seu metabolismo à glicólise aeróbica (Efeito Warburg). Tal situação mantém um aporte energético necessário para o crescimento tumoral, ao mesmo tempo em que o estroma glicolítico reduz o estresse oxidativo em células cancerígenas, protegendo-as da apoptose, autofagia e senescência (Martinez-Outschoorn et al., 2013; Schwarz, 1996). Um resumo esquemático do sinergismo entre epitélio-estroma na criação de um microambiente favorável à malignização é mostrado na figura 24.

Figura 24 – Esquema de sinergismos epitélio-estroma

As células epiteliais infectadas com BPV expressam RAS e NF-κB, elevando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas, que são exportadas para o estroma, onde fibroblastos, estimulados por ROS e citocinas ativam vias de glicólise anaeróbica, exportando lactato e corpos cetônicos para o epitélio, conferindo um importante aporte energético, necessário ao desenvolvimento tumoral. Fonte: Modificado de Schwarz (1996).

5.6 Isolamento Viral

Em face da dimensão do rebanho bovino nacional e das importantes perdas econômicas decorrentes da papilomatose bovina, faz-se necessário investir no desenvolvimento de vacinas profiláticas e/ou terapêuticas (Carvalho et al., 2003; Freitas et al., 2011; Nascimento et al., 2012). Neste cenário, observa-se um grande investimento em vacinas baseadas em VLPs (*Virus Like Particles*), complexos proteicos capazes de se auto-organizarem formando estruturas similares a de vírus nativos, porém sem o material genético (Park et al., 2008; Rodríguez-Limas et al., 2012).

Embora imunogênicas e seguras, já que não carregam material genético, VLPs da proteína L1 são de difícil reconstrução devido a sua heterogeneidade de tamanho (Kirnbauer et al., 1996; Rodríguez-Limas et al., 2012; Trus et al., 1997), enquanto que L2 sofre modificações pós-traducionais que dificultam sua reconstrução *in vitro* (Rodríguez-Limas et al., 2012; Wang, Roden, 2013). Como uma alternativa temos produtos vacinais de proteínas recombinantes (Campo et al., 1993; Kirnbauer et al., 1996), como por exemplo, a proteína E6 (Mazzuchelli-de-Souza et al., 2013).

Outro desafio enfrentado na produção de vacinas para papilomavírus é a inexistência de um sistema de replicação viral *in vitro*, já que a regulação gênica e a montagem viral são

dependentes da diferenciação celular (Campo, 1997; De Villiers, 2013; Kirnbauer et al., 1996; McBride et al., 2000; Meyers et al., 1992; Johansson, Schwartz, 2013), havendo uma notável dificuldade de obtenção de culturas organotípicas (McBride, Dlugosz, Baker, 2000).

Neste cenário, o investimento em novas metodologias de isolamento de papilomavírus, representa um importante avanço na biotecnologia de vacinas, permitindo a realização de desafios imunológicos (De Villiers, 2013; Kirnbauer et al., 1996; Pereira, 2008; Wang, Kielf, 2013).

As técnicas de isolamento viral de vírus de DNA dupla-fita (dsDNA), descritas até o momento, são laboriosas e relativamente caras, requerendo complicados procedimentos de obtenção uma quantidade de partículas virais completas (vírions) satisfatória (Bujard et al., 1967; Karger et al., 1998).

Desde o desenvolvimento da técnica de ultracentrifugação para isolamento viral, esta vem sendo frequentemente utilizada (Zheng et al., 1996). A maioria dos trabalhos envolvendo o isolamento de vírions de PVs empregam a ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério (CsCl), acrescido de um colchão de sacarose a 40% (Baker et al., 1991; Bujard et al., 1967; Crawford, Crawford, 1963; Favre et al., 1974; Vanslyke et al., 1993; Zhou et al., 1995).

A ultracentrifugação em gradiente de concentração promove a compressão das soluções, resultando em um contínuo aumento de densidade na direção da força centrífuga (Meselson et al., 1957), o que permite o isolamento de partículas virais inteiras (vírions) de BPV. Tais partículas apresentam uma densidade flutuante de 1,34 g/ml em CsCl e partículas vazias (capsídeos sem material genético), com densidade flutuante de 1,29 g/mL (Lancaster, Olson, 1982). Os vírions de BPV apresentam um coeficiente de sedimentação de 296S a 300S (Lancaster, Olson, 1982).

Entretanto, alguns problemas foram frequentemente observados em trabalhos prévios envolvendo o isolamento de BPV, tais como: a dificuldade de concentrar o *pellet* de vírions em múltiplos passos de ultracentrifugação (Karger et al., 1998; Wang et al., 2007), dificuldade em se obter os gradientes de centrifugação e a obtenção de capsídeos vazios, reduzindo o rendimento de partículas isoladas (Favre et al., 1974; Karger et al., 1998; Wang, Roden, 2013).

O uso da metodologia proposta no presente trabalho, resultado da adaptação daquelas previamente descritas na literatura, permitiu o isolamento de partículas inteiras de BPV de forma satisfatória. Sabendo-se que as amostras foram previamente tipificadas por métodos moleculares, foi obtido no final do procedimento o isolamento de partículas virais tipo específica (BPV-2). Não foram coletas amostras suficientes, em termos de peso, dos demais tipos identificados no

presente trabalho (BPV-3, 5, 9 e BR/UEL2) já que a técnica de isolamento requer no mínimo 40 g de tecido para a concentração de um *pellet* viral.

As partículas virais de BPV-2 foram estocadas em tubos de criopreservação a -80°C. Com o desenvolvimento e padronização da metodologia proposta neste estudo, à medida que outros tipos virais forem identificados em novas amostras de papilomas, outros tipos virais poderão ser isolados com igual êxito. Além do mais, a técnica aqui descrita, pode também ser aplicada ao isolamento de HPV ou outros PVs, já que os vírus possuem a mesma densidade.

Após o isolamento viral, uma alíquota do *pellet* foi submetida à microscopia eletrônica de transmissão (M.E.T.) para confirmar a presença de partículas virais. Desde 1938, a M.E.T. tornou-se uma importante ferramenta na descoberta e descrição de vírus, sendo empregada na elucidação de mecanismos replicativos e, mesmo na era da biologia molecular, continua sendo imprescindível no desenvolvimento de vacinas (Goldsmith, Miller, 2009).

De acordo com Goldsmith e Miller (2009), o aumento de 100.000X é recomendado para a visualização de vírus desprovidos de envelope e icosaédricos, tal como o BPV. Além do mais, de acordo com os mesmo autores, para se obter a visualização de vírions através de microscopia eletrônica de transmissão, faz-se necessário que haja entre 10^5 e 10^6 partículas virais/ μ L (Pereira, 2008).

Os resultados de M.E.T. revelaram que o isolamento viral ocorreu de forma satisfatória, evidenciando um elevado número de partículas virais, com aproximadamente 55nm, correspondente ao diâmetro do BPV, conforme figura 25.

Figura 25 – Vírions de BPV isolados a partir de amostras de papilomas

Partículas de BPV-2 isoladas com a nova metodologia proposta e visualizadas em aumento de 16.000X (A), 36.000X (B), 75.000X (C), 120.000X (D) e 270.400X (E).

Entretanto, não foi possível realizar a titulação viral, isto porque, de acordo com Pereira (2008), há dois métodos de titulação viral disponíveis: (1) método de placas – baseado no princípio infectante dos vírus, que ao ser transmitido para a célula vizinha causa a morte celular, em face do ciclo lítico, permitindo a visualização de células mortas com o emprego de um corante e, (2) método da diluição limite – através do qual uma suspensão viral é diluída

sucessivamente com um fator de diluição de 1:10 e, as diferentes diluições são inoculadas em culturas susceptíveis. Após o período de replicação viral, observa-se o número de culturas que apresentam sinais de infecção, obtendo-se assim a diluição capaz de provocar a infecção de 50% das culturas inoculadas (TCID_{50%}). Entretanto, ambos os métodos de titulação não são aplicáveis aos PVs, pois o vírus não é cultivável. Porém, pode-se assegurar a existência de no mínimo 10⁵ partículas virais/μL, já que esta é a concentração mínima exigida para a visualização viral sob M.E.T. (Pereira, 2008).

A metodologia empregada neste trabalho apresentou-se menos laboriosa do que a descrita em trabalhos anteriores, que empregavam o uso de gradiente de CsCl acrescido de um colchão de sacarose, ao mesmo tempo em que se mostrou eficiente no isolamento de vírions de BPV. Outra vantagem obtida no uso desta metodologia consistiu em se obter uma única banda, composta por partículas virais inteiras de BPV, não tendo sido observada a formação de uma segunda banda, composta de capsídeos sem DNA viral. A formação desta segunda banda representava uma das dificuldades relatadas na literatura, pois reduzia o número de vírions isolados (Favre et al., 1974).

O rompimento dos capsídeos está associado aos múltiplos passos de centrifugação empregados nas metodologias já publicadas, já que a força centrífuga é um agente denaturante físico (Speir et al., 1995). Resultados semelhantes até a presente data, só foram obtidos através da purificação em gel de *Sephacryl® S-1000 Supreme*, em uma metodologia que não envolvia a ultracentrifugação (Hjorth, Moreno-Lopez, 1982).

Outra importante alteração consistiu na substituição do sarcosil, um surfactante iônico derivado da sarcosina com atividade inibitória da transcrição do DNA pelo dodecil sulfato de sódio (SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*), outro surfactante iônico. A substituição ocorreu em face de suas propriedades semelhantes e de seus pesos moleculares relativamente próximos, sendo 293,38g/mol do sarcosil e 288,38g/mol do SDS, respectivamente.

Tendo em vista que nos últimos anos houve um nítido aumento na preocupação com doenças de caráter infectocontagiosas, principalmente em face do intercâmbio no mundo globalizado, que ao permitir um rápido fluxo intercontinental, permite a rápida propagação de doenças emergentes, o que pode ser aplicado ao cenário médico-veterinário, já que sequências de BPV já foram detectadas em sêmen e, que o vírus é cosmopolita e altamente distribuído em rebanhos bovinos. Independentemente do nível de tecnificação pecuária, o desenvolvimento de produtos vacinais faz-se necessário (Cascales et al., 2009; Holmes, 2001).

O envolvimento do sistema imunológico no controle das infecções decorrentes de BPV leva a ideia de formulação de vacinas há mais de 70 anos (Campo, 1997). Entretanto, o

desenvolvimento de fármacos é extremamente complexo, árduo, e caro, embora os custos efetivos tanto do processo biotecnológico de pesquisa e desenvolvimento (P&D), quanto do produto final, sejam inferiores aos custos demandados com o tratamento de doenças como câncer ou aqueles gerados devidos aos prejuízos econômicos decorrentes da papilomatose bovina (Inglis et al., 2006).

O isolamento de tipos específicos de BPV é fundamental para o desafio imunológico, permitindo a validação de produtos vacinais através de ensaios *in vivo*, como por exemplo, o teste de hemaglutinação – método de quantificação de anticorpos neutralizantes em amostras de plasma, com sensibilidade superior ao método ELISA (Cohen et al., 2007), permitindo a validação da eficácia imunogênica dos produtos candidatos a entrarem no mercado como vacinas contra o BPV.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste realizado com os *primers* mostrou que os específicos para BPV-1 e 2 se apresentaram mais sensíveis do que os degenerados na identificação de BPV. Entretanto, tais *primers* apresentam a desvantagem de não detectar novos tipos virais. Os *primers Delta-Epsilon* e *Xi* mostraram-se mais eficientes na identificação viral quando comparados com os iniciadores FAP59/64 e MY09/11.

Desta forma, os pares de *primers Delta-Epsilon* e *Xi* podem ser empregados de forma combinada na identificação de BPV, podendo ser empregados com sucesso seja em estudos epidemiológicos como no processo de tipificação viral para isolamento de BPV tipo-específico, como proposto neste trabalho.

O estudo apontou uma elevada frequência de papilomas cutâneos em áreas mais expostas a atritos físicos. Este dado pode ser justificado pelo mecanismo de infecção viral, que requer uma micro-lesão tecidual e a exposição de receptores de sulfato de heparina para que o BPV possa ser internalizado na célula hospedeira.

A tipagem viral, por meio de sequenciamento, mostrou uma prevalência de BPV-2 em 81,81% das amostras analisadas. Embora o BPV-2 tenha sido o tipo mais frequente na população estudada, não foram constatados sinais clínicos sugestivos de câncer de bexiga. A ausência da malignidade pode ser justificada pela ausência da pteridófita *P. aquilinum* na propriedade.

Foi, também, identificada a presença do suposto novo tipo viral BR/Uel-2 em uma amostra. A presença deste novo suposto tipo aponta a diversidade viral, bem como sua ampla distribuição, já que o vírus foi primeiramente identificado no Estado do Paraná, sendo este seu primeiro registro no Estado de São Paulo. Este achado nos remete à necessidade de estudos epidemiológicos a nível nacional a fim de se buscar um perfil de tipos circulantes no Brasil.

A análise histopatológica mostrou a presença de coilocitose, hipergranulose e hiperqueratose. As biópsias dos fragmentos de papilomas permitiu identificar a presença de fibroblastos transformados, sendo este um importante achado posto que a transformação celular é um dos eventos associados à malignização.

A transformação celular está associada à ação combinada das oncoproteínas E5, E6 e E7, que promovem alterações na actina do citoesqueleto e induzem eventos mitogênicos e clastogênicos, como aqueles observados pelo ensaio cometa. A transformação de fibroblastos cria um microambiente favorável ao desenvolvimento tumoral, no qual se observa um sinergismo entre a epiderme e a derme no tocante as transferências energéticas. Estes dados podem explicar como lesões *a priori* benignas (papilomas) podem se malignizar.

Além do mais, a imuno-deteção das proteínas L1 e E7 na derme, próximo a fibroblastos anaplásicos e pleomórficos, confirma a presença do BPV na derme. A marcação

imunoistoquímica da proteína L1 sugere que sítios menos diferenciados podem ser locais de infecções produtivas.

A imuno-deteção de proteínas de papilomavírus em outros sítios como células trofoblásticas, blastocistos, placenta e fibroblastos transformados tem sido relatada na literatura. Os resultados histopatológicos e a marcação das proteínas L1 e E7 em estroma sustenta o papel do sangue como veículo disseminador de vírus.

O ensaio cometa de amostras de papilomas revelou um alto índice clastogênico. Está foi a primeira vez em que o ensaio foi empregado para avaliar o potencial clastogênico do BPV *in situ*. Resultados semelhantes já foram observados em sangue periférico de animais sintomáticos e assintomáticos infectados por BPV. Sabe-se, também, que o vírus induz uma série de danos citogenéticos já demonstrados na literatura.

Embora os BPV-1, 2 e 4 estejam associados a tumores malignos, os resultados do ensaio cometa mostraram que os tipos virais 2, 5 e 9 apresentam o mesmo potencial clastogênico. Este dado eleva a atenção para a infecção pelo BPV, uma vez que sob a óptica da mutagênese, estes tipos são capazes de gerar a instabilidade genômica, tida como o primeiro passo para a carcinogênese.

A combinação de técnicas empregadas no presente estudo permitiu reforçar o papel oncogênico do BPV de acordo com os critérios propostos por Wang e Kieff (2013) e sugerir o papel do vírus no estabelecimento de um microambiente favorável à malignização, havendo um sinergismo entre o epitélio e o estroma, contribuindo para o Efeito Warburg, ao mesmo tempo em que permitiram um diagnóstico eficaz e preciso que garantiu o isolamento de partículas de BPV-2.

A metodologia de isolamento viral, descrita no presente trabalho, permitiu o isolar partículas completas de BPV-2, iniciando assim o banco de vírus do Laboratório de Genética do Instituto Butantan. A técnica mostrou-se altamente eficaz e reprodutível, apresentando-se menos laboriosa do que àquelas já publicadas e apresentando soluções práticas para alguns dos problemas frequentemente relatados na literatura, tal como a dificuldade de concentração de um *pellet* e o baixo rendimento de obtenção de partículas virais inteiras, associado ao elevado custo de tempo.

Entre as adaptações que permitiram o êxito da metodologia aqui proposta incluem-se: (1) a substituição do sarcosil pelo SDS, sendo este é um reagente de fácil obtenção; (2) o emprego de uma solução com concentração única de cloreto de cério, na densidade de 1,3 g/ml, reduzindo assim a necessidade de obtenção de um gradiente de CsCl, o que demanda passos adicionais de centrifugação para comprimir as soluções e obter o gradiente, representado um custo de tempo

adicional; (3) a não utilização de um colchão de sacarose a 40%, tal como descrito em metodologias já publicadas, representando uma redução de custos em termo de reagentes; (4) a redução das múltiplas etapas de centrifugação, evitando assim o rompimento do capsídeo viral e a consecutiva redução no rendimento em termos de número de partículas completas de PVs isolados, permitindo a obtenção de única banda compostas por vírus, resolvendo, assim, a dificuldade de concentração do *pellet* viral.

Esta nova metodologia pode ser empregada com igual êxito no isolamento de novos tipos de BPV ou mesmo de HPV, isto porque ela é baseada na técnica de centrifugação isopícnica, de modo que permite o isolamento de vírus que apresentem a mesma densidade flutuante da solução de CsCl. A metodologia proposta neste trabalho foi submetida a publicação, conforme Apêndice B.

Em resumo, os estudos acerca dos BPVs são de grande interesse biológico, clínico e econômico, já que o vírus está diretamente associado a perdas econômicas que afetam todos os segmentos da cadeia produtiva, demandando investimento maciços nos setores de P&D de vacinas profiláticas e/ou terapêuticas.

Neste sentido, o isolamento de BPV tipo específico pode contribuir nos estudos de ensaios vacinais, permitindo a realização de desafios imunológicos necessários na fase I de experimentação de novos produtos candidatos a entrarem no mercado como vacinas.

REFERÊNCIAS*

- Alberti A, Perino S, Pintare F, Addis MF, Chessa B, Cacciotto C, Cubeddu T, Anfossi A, Benenati G, Coradduzza E, Lecis R, Antuofermo E, Carcangiu L, Pittau M. *Ovis aries* Papillomavirus 3: A prototype of a novel genus in the family *Papillomaviridae* associated with ovine squamous cell carcinoma. *Virology*. 201;407:352-9.
- Alli A, Rossinck MJ. Rapid and efficient purification of *Cowpea chlorotic mottle virus* by sucrose cushion ultracentrifugation. *J Virol Methods*. 2007;141:84-6.
- Anjos BL, Silva MS, Brito ADMF, Seppa GS, Brum MCS. Sarcoide equino associado ao papilomavírus bovino BR-UEL-4. *Ciência Rural*. 2010;40(6):1456-9.
- Araldi RP, Carvalho RF, Melo TC, Diniz NSP, Sant'Ana TA, Mazucchelli-de-Souza J, Spadaci-Morena DD, Beçak W, Stocco RC. Bovine papillomavirus in beef cattle: first description of BPV-12 and putative type BAPV8 in Brazil. *Genet Mol Res*. 2014. In press.
- _____, Melo TC, Diniz N, Mazzucchelli-de-Souza J, Carvalho RF, Beçak W, Stocco RC. Bovine papillomavirus clastogenic effect analyzed in comet assay. *BioMed Res Int*. 2013;2013:630683.
- _____, Richiutti BM, Mendes TB, Ito ET, Souza EB. Study of mutagenic potential of anti-obesity drugs: *Cordia ecalyculata* and its association to *Spirulina maxima*. *Genet Mol Res*. 2014. In press.
- Ayres M. Software BioEstat Versão 5.3. 2007.
- Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol*. 2013;83:949-68.
- Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowset LM, Olson C, Brown JC. Structure of bovine and human papillomavirus. *Biophys J*. 1991;60:1445-56.
- Balcos LGF, Borzacchiello G, Russo V, Popescu O, Roperto S, Roperto F. Association of bovine papillomavirus type-2 and urinary bladder tumours in cattle from Romania. *Res Vet Sci*. 2008;85:145-8.
- Betiol JC, Kignell S, Tristão W, Arruda AC, Santos SKS, Barbieri R, Bettini JSR. HPV18 prevalence in oral mucosa diagnosed with verrucous leukoplakia: cytological and molecular analysis. *J Clin Pathol*. 2012;65:769-70.
- Bian XL, Rosas-Acosta G, Wu YC, Wilson VG. Nuclear importance of Bovine papillomavirus type 1 E1 protein is mediated by multiple alpha importins and negatively regulated by phosphorylation near a nuclear localization signal. *J Virol*. 2007;81(6):2899-908.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscript submitted to Biomedical Journal: sample references. (Cited 2011 jul 15). Disponível em: <http://www.icmje.org>

Borzacchiello G, Ambrosio V, Roperto S, Poggiali F, Tsirimonakis E, Venuti A, Campo MS, Roperto F. Bovine papillomavirus type 4 in Oesophageal papillomas of cattle from the South Italy. *J Comp Pathol*. 2003;128:203-6.

_____. Russo V, Gentill F, Venuti A, Nitsch L, Campo MS, Roperto S. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor β receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. *Oncogene*. 2006;25:1251-60.

_____. Bovine papillomavirus infections in animals. *Comm Curr Res Educ Topics and Trends in Applied Microbiol*. 2007;673-9.

_____. Bovine papillomavirus on the scene of crime: is E5 oncogene the only guilty party? *Infect Agent Cancer*. 2013;8(1):26.

Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhler S, Speit G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*. 2005;20(4):245-54.

Buck CB, Pastrana PV, Lowy DR, Schuller JT. Efficient intracellular assembly of papillomavirus vectors. *J Virol*. 2004;78(2):751-7.

Bujard H. Studies on circular deoxyribonucleic acid I – Isolation of bovine papilloma virus and characterization of its deoxyribonucleic acid. *J Virol*. 1967;1(6):1135-8.

Burnett S, Jareborg N, DiMaio D. Localization of bovine papillomavirus type 1 E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue. *PNAS*. 1992;89:5665-9.

Cai Q, Lv L, Shao Q, Li X, Dian A. Human papillomavirus early proteins and apoptosis. *Ach Gynecol Obstet*. 2013;287:541-8.

Calinisan JH, Chan SR, King A, Chan PJ. Human papillomavirus and blastocyst apoptosis. *J Assist Reprod Genet*. 2002;19(3):132-6.

Campo MS, Grindlay GJ, O'Neil BW, Chandrachud LM, McGarvie GM, Jarret WFH. Prophylactic and therapeutic vaccination against a mucosal papillomavirus. *J General Virol*. 1993;74:945-53.

_____. Vaccination against papillomavirus in cattle. *Clin Dermatol*. 1997;15:275-83.

_____. Bovine papillomavirus and cancer. *Vet J*. 1997;154:175-88.

_____. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res*. 2002;89:249-61.

Campos SRC, Trindade C, Ferraz OP, Giovanni DNS, Lima AA, Caetano HVA, Carvalho RF, Birgel JR EH, Dagli MLZ, Mori E, Brandão PE, Richtzenhein LJ, Beçak W, Stocco RC. Can established cultured papilloma cells harbor bovine papillomavirus? *GMR*. 2008;7(4):1119-26.

Campos SRSCLC. Estudos integrados sobre o vírus do Papilomavírus bovino: aspectos morfológicos, citológicos, moleculares e citogenéticos [tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo, SP: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2011. 109 f.

Cartaxo MHB, Martins AMCRPF, Petrulla S, Souza F, Nastari BDB. Ultrastructural study of bovine papillomavirus during outbreaks in Brazil. *Int J Morphol*. 2013;31(2):777-84.

Carvalho C, Freitas AC, Brunner O, Góes LGB, Cavalcante AY, Beçak W. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine female. *Braz J Microbiol*. 2003;34(supl. 1):82-4.

Carvalho CCR, Batista MVA, Silva MAR, Balbino VQ, Freitas AC. Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and putative new BPV11 subtypes in cattle. *Transbound Emerg Dis*. 2012;59(5):441-7.

Carvalho RF, Sakata ST, Giovanni DNS, Mori E, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Pozzi CR, Arcaro JRP, Miranda MS, Mazzuchelli-de-Souza J, Melo TC, Comenale G, Assaf SLMR, Beçak W, Stocco RC. Bovine papillomavirus in Brazil: detection of coinfection of unusual types by a PCR-RFLP method. *BioMed Res Int*. 2013;2013:270898.

Cascales R, Alcantara BK, Molinari BLD, Lopes FA, Bodnar L, Filippsen P, Tozato CC, Medeiros TNS, Alfieri AF. Estudo histopatológico de lesões neoplásicas benignas, determinadas pelo papilomavírus bovino, localizadas em tetos e úberes de vacas leiteiras In. *Anais do XVIII Encontro Anual de Iniciação Científica*; 2009 set-out 30-02; Londrina, Brasil. 2009.

Castella S, Burgin D, Sanders CM. Role of ATP hydrolysis in the DNA translocase activity of the papillomavirus (BPV-1) E1 helicase. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(13):3731-41.

Chevillle NF, Olson C. Cytology of the canine oral papilloma. *Am J Pathol*. 1964;45(5):849-72.

_____. Introdução à patologia veterinária. 2. ed. São Paulo: Editora Roca; 2004. 334 p.

Claus MP, Vivian D, Lunardi M, Alfieri AF, Alfieri AA. Análise filogenética de papilomavírus bovino associado a lesão cutânea em rebanhos do Estado do Paraná. *Pesqui Vet Bras*. 2007;27(7):314-8.

Cohen BJ, Audet S, Andrews N, Beeler J. Plaque reduction neutralization test for measles antibodies: Description of a standardized laboratory method for use in immunogenicity studies of aerosol vaccination. *Vaccine*. 2007;26:59-66.

Córtés-Gutiérrez EI, Hernández-Garza F, García-Pérez JO, Dávila-Rodríguez MI, Aguado-Barrera ME, Cerda-Flores RM. Evaluation of DNA single and double strand breaks in women with cervical neoplasia on alkaline and neutral comet assay techniques. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:385245.

Costa AMD, Souza DPM, Cavalcante TV, Araújo VL, Ramos AT, Mauro VM. Plantas tóxicas de interesse pecuário em regiões de ecótono Amazônia e Cerrado. Parte II: Araguaína, Norte do Tocantins. *Acta Vet Bras*. 2002;5(3):317-24.

Crawford LV, Crawford LV. A comparative study of Polyoma and Papilloma viruses. *Virol*. 1963;21:258-63.

Crowther JR. ELISA – Theory and Practice. *Methods Mol Biol*. 1995;42:1-128.

Del Fava C, Verissimo CJ, Rodrigues CFC, Cunha EA, Ueda M, Maiorka PC, D'Angelino JL. Occurrence of squamous cell carcinoma in sheep from a farm in São Paulo state, Brazil. *Arq Inst Biol*. 2001;68(1):35-40.

Demasi J, Huh KW, Nakatani Y, Münger K, Howley PM. Bovine papillomavirus E7 transformation function correlates with cellular p600 protein binding. *PNAS*. 2005;102(32):11486-91.

_____, Chao MC, Kumr AS, Howley PM. Bovine papillomavirus E7 oncoprotein inhibits anoikis. *J Virol*. 2007;87(7):9419-25.

De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virol*. 2004;324:17-27.

_____. Cross-roads in the classification of papillomavirus. *Virol*. 2013;445:2-10.

Dias JDC, Sgnacchiti MDC, Giuriato PGG, Nunes LC, Pereira-Júnior OS. Detecção do papilomavírus bovino tipo 2 em bexigas de bovinos com hematúria enzoótica pela técnica de reação de cadeia de polimerase no Sul do Espírito Santo. *Rev Bras Med Vet*. 2012;34(2):146-51.

Doobar J. The E4 protein, structure, function and patterns of expression. *Virol*. 2013;445:80-98.

Doorlaer K. Evolution of the Papillomaviridae. *Virol*. 2013;445:11-20.

Duensing S, Münger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res*. 2002;62:7075-82.

Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: Optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(4):559-70.

Elzein ETE, Sundberg JP, Housawi FM, Gameel AA, Ramadan RO, Hassanein MM. Genital bovine papillomavirus infection in Saudi Arabia. *J Vet Diagn Invest*. 1991;3(1):36-8.

Enemark EJ, Chen G, Vaughn DE, Stenlund A, Joshua-Tor L. Crystal structure of the DNA binding domain of the replication initiation protein E1 from papillomavirus. *Mol Cell*. 2000;6:149-58.

Favre M, Breitburd F, Croissant O, Orth G. Structural polypeptides of rabbit, bovine and human papillomaviruses. *J Virol*. 1975;15(5):1239-47.

_____, Breitburd F, Croissant O, Orth G. Hemagglutinating activity of bovine papillomavirus. *Virol*. 1994;60:572-8.

Fernandes MC, Ribeiro MG, Fedato FP, Paes AC, Megid J. Papilomatose oral em cães: revisão da literatura e estudo de doze casos. *Semina: Ciências Agrárias*. 2009;30(1):215-24.

Fernandes JV, Araújo JMG, Fernandes TAAM. Biology and natural history of human papillomavirus. *Open Access Journal of Clinical Trial*. 2013;5:1-12.

Ferraro CTL, Canedo NHS, Oliveira SP, Carvalho MGC, Dias EP. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. *J Bras Patol Med Lab.* 2011;47(4):451-9.

Fett-Conte A, Salles ABCF. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2002;24(2):85-9.

Finlay M, Yuan ZQ, Burden F, Trawford A, Morgan IM, Campo MS, Nasir L. The detection of bovine papillomavirus type 1 DNA in flies. *Virus Res.* 2009;144(1-2):315-7.

Fletcher S. Histopathology of papilloma virus infection of the cervix uteri: the history, taxonomy, nomenclature and reporting of koilocytic dysplasias. *J Clin Pathol.* 1983;36:616-24.

Flores M, Yamaguchi UM. Teste do Micronúcleo: uma triagem para a avaliação genotóxica. *Revista Saúde e Pesquisa.* 2008;1(3):337-40.

Florin L, Sapp M, Spoden GA. Host-cell factors involved in papillomavirus entry. *Med Microbiol Immunol.* 2012;201(4):437-48.

Forslund O, Antonsson A, Nordin P, Stenquest B, Hansson BG. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method. *J Gen Virol.* 1999;80:2437-43.

Freitas AC, Carvalho C, Brunner O, Birgel JR EH, Dellalibera AMMP, Benesi FJ, Gregory L, Beçak W. Viral DNA sequence in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Braz J Microbiol.* 2003;34(supl.1):76-8.

_____, Silva MAR, Carvalho CCR, Birgel JR EH, Santos JF, Beçak W, Stocco dos Santos RC. Papillomavirus DNA detection in non-epithelial tissue: a discussion about bovine papillomavirus. *Comm Curr Res Educ Topics and Trends Applied Microbiol.* 2007;697-704.

_____, Silva MAR, Jesus ALS, Mariz FC, Cordeiro MN, Albuquerque BM, Batista MVA. Recent insights into Bovine papillomavirus. *Afri J Microbiol Res.* 2011;5(33):6004-12.

Góes LGB, Freitas AC, Ferraz OP, Rieger TT, Santos JF, Pereira A, Beçak W, Lindsey CJ, Stocco RC. Bovine papillomavirus type 4 L1 gene transfection in a *Drosophila* S2 cell expression. System absence of L1 protein expression. *Braz J Microbiol.* 2008;39(1):1-4.

Godschalk RWL, Ersson C, Riso P, Porrini M, Langie SAS, Schooten FJ, Azqueta A, Collins AR, Jones GDD, Kwork RWL, Philips DH, Sozeri O, Allione A, Matullo G, Möller L, Forchhammer L, Loft S, Møller P. DNA-repair measurements by use of the modified comet assay: An inter-laboratory comparison within the European Comet Assay Validation Group (ECVAG). *Mutat Res.* 2013;757(1):60-7.

Goldsmith CS, Miller SE. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):552-63.

Gottschling M, Göker M, Stamatakis A, Bininda-Emonds ORP. Quantifying the photodynamic forces driving papillomavirus evolution. *Mol Biol Evo.* 2011;28(7):2101-13.

Gander J. History of infectious disease oncology. In: Goedert JJ. Infectious causes of cancer. Totowa: Editora Humana Press; 2000. p. 3-30.

Grce M, Sabol I, Gasperov N.M. The transforming properties of human papillomavirus oncoproteins. *Periodicum Biologorum*. 2012;114(4):479-87.

Hartt B, Hainisch EK, Shafiti-Keramati S, Kirnbauer R, Corteggio A, Borzacchiello G, Tober R, Kainzbauer C, Pratscher B, Brandt S. Inoculation of young horses with bovine papillomavirus type 1 virions leads to early infection of PBMCs prior to pseudosarcoid formation. *J Gen Virol*. 2011;92:2437-45.

Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 2003;18(1):45-51.

Hatama S, Ishihara R, Ueda Y, Kanno T, Uchia I. Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using Xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. *Ach Virol*. 2011;156(7):1281-5.

Hecker KH, Roux KH. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques*. 1996;20(3):478-85.

Hjorth R, Moreno-Lopez J. Purification of bovine papillomavirus by gel filtration on Sephacryl® S-1000 Supreme. *J Virol*. 1982;5:151-8.

Hobre RJ, Herráez-Hernández E, Fei JW, Langbein L, Kaden S, Gröne HJ, Velliers EM. E7 oncoprotein of novel Human Papillomavirus type 108 lacking the E6 gene induces dysplasia in organotypic keratinocyte cultures. *J Virol*. 2009; 83(7):2907-16.

Hollando J, Domingo E. Origin and evolution of viruses. *Virus Genes*. 1998;16(1):13-21.

Holmes EC. On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV). *Biol Rev*. 2001;76:239-54.

Inglis S, Shaw A, Koenig S. HPV vaccines: Commercial research & development. *Vaccine*. 2006;24(53):99-105.

International Agency for Cancer Research (IARC). Disponível em: <http://screening.iarc.fr/atlasglossdef.php?lang=4&> [15 dez 2013].

International Committee on Taxonomy of Viruses. 2014. Disponível em http://ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20120358&taxa_name=Papillomaviridae. Acesso 04 junho 2014.

Jarret WFH, Smith KT, O'Neil BW, Gaukroger JM, Chandrachud LM, Grindlay GL, McGarvie GM, Campo MS. Studies on vaccination against Papillomavirus: prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. *Virology*. 1991;184:32-42.

Jelínk F, Tachezy R. Cutaneous papillomatosis in cattle. *J Comp Pathol*. 2005;132:70-81.

Jessen H. Two types of keratohyalin granules. *J Ultrastruc Res*. 1970;33:95-115.

Johansson C, Schwartz S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(4):239-51.

Jones T, Ye F, Bedolla R, Huang Y, Meng J, Qian L, Pan H, Zhou F, Moody R, Wagner B, Arar M, Gao S. Direct and efficient cellular transformation of primary rat mesenchymal precursor cells by KSHV. *J Clin Invest*. 2012;122(3):1076-81.

Karger A, Bettin B, Granzow N, Mettenleiter TC. Simple and rapid purification of alphaherpesviruses by chromatography on a cation exchange membrane. *J Virol Methods*. 1998;70:219-24.

Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human monitoring. *Mutat Res*. 2000;463:13-31.

Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, Wagner ER, Grindlay GJ, Armstrong A, McGavie GM, Schiller JT, Lowy DR, Campo MS. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology*. 1996;219:37-44.

Khoei S, Delfan S, Neshsteh-Riz A, Mahdavi SR. Evaluation of the combined effect of 2ME2 and ⁶⁰Co on the inducement of DNA damage by IUdR in a spheroidal model of the U87MG glioblastoma cancer cell line using alkaline Comet Assay. *Cell Journal*. 2011;13(2):83-90.

Krawczyk KE, Supryniewicz FA, Liu X, Day Y, Hartmann DP, Hanover J, Schlegel R. Koilocytosis: A cooperative interaction between the Human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol*. 2008;173(3):682-8.

Kurg R, Tekkel H, Abroi A, Ustav M. Characterization of the functional activities of Bovine Papillomavirus type 1 E2 protein single-chain heterodimers. *J Virol*. 2006;80(22):11218-25.

Lace MJ, Ushikai M, Yamakawa Y, Anson JR, Ishiji T, Turik LP, Haugen TH. The truncated C-terminal E2 (E2-TR) protein of bovine papillomavirus (BPV) type 1 is a transactivator that modulates transcription in vitro in a manner distinct from the E2-TA and E8 E2 gene products. *Virology*. 2012;429:99-111.

Lancaster WD, Olson C. Animal papillomaviruses. *Microbiol Rev*. 1982;46(2):191-207.

Larsen PM, Storgaard L, Fey SJ. Proteins present in bovine papillomavirus particles. *J Virol*. 1987;61(11):3596-601.

Leonard SM, Wei W, Collins SI, Pereira M, Diyaf A, Constandinou-Willians C, Yoring LS, Roberts S, Woodman CB. Oncogenic human papillomavirus imposes an instructive pattern of DNA methylation changes with parallel the natural history of cervical HPV infection in young women. *Carcinogenesis*. 2012;33(7):1286-93.

Leto MGP, Santos-Júnior GF, Porro AM, Tomimori J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol*. 2011;86(2):306-17.

Linhart C, Shamir R. The degenerate primer design problem. *Bioinformatics*. 2002;18(supl. 1):S172-S180.

Liu WJ, Gissmann L, Sun XY, Kanjanahaluethai A, Müller M, Doorbar J, Zhu J. Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions. *J Virol.* 1997;227:474-83.

Liu Y, Baleja JD. Structure and function of the papillomavirus E6 protein and its interacting proteins. *Front Biosci.* 2008;13:121-34.

Löhr CV, Juan-Sallés C, Rosas A, García AP, Garner MM, Teifke JP. Sarcoids in captive zebras (*Equus burchellii*): association with bovine papillomavirus type 1 infection. *J Zoo Wildl Med.* 2005;36(1):74-81.

Longo DL. Biologia celular e angiogênese do câncer In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Medicina interna de Harrison.* 18. ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2013. p. 672-88.

Love AJ, Champmam SH, Matic S, Noris E, Lomonossoff GP, Taliansky M. In planta production as a candidate vaccine against bovine papillomavirus type 1. *Planta.* 2012;236(4):1305-13.

Lowley LD, McCall CO, Lowley TJ. Eczema, psoríase, infecções cutâneas, acne e outras doenças de pele comuns In Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Medicina Interna de Harrison.* 18. ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2013. 395-404 p.

Lucena RB, Rissi DR, Kommers GD, Pierezan F, Oliveira-Filho JC, Macêdo JTSA, Flores MM, Barros CSL. A retrospective study of 586 tumours in Brazilian cattle. *J Comp Path.* 2011;145:20-4.

Lunardi M. Caracterização molecular do gene L1 de um provável novo tipo de papilomavírus bovino identificado no Brasil. [dissertação (Mestrado em Ciência Animal)]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2008.

_____, Claus MP, Alfieri AA, Fungaro MHP, Alfieri AF. Phylogenetic position of uncharacterized Brazilian strain of bovine papillomavirus in the genus *Xipapillomavirus* based on sequencing of L1 open reading frame. *Gen Mol Biol.* 2010;33(4):745-9.

_____, Alfieri AA, Otonel RAA, Alcântara BK, Rodrigues WB, Miranda AB, Alfieri AF. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet Microbiol.* 2012;162(1):207-13.

_____, Alcântara BK, Otonel-Arillano RA, Rodrigues WB, Alfieri AF, Alfieri AA. Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoid. *J Clin Microbiol.* In press.

Madoff LC, Kasper DL. Introdução às doenças infecciosas: Interações patógeno-hospedeiro In Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Medicina interna de Harrison.* 18. ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2013. p. 1007-12.

Maiolino P, Özkul A, Sepici-Dincel A, Roberto F, Yücel G, Russo V, Urraro C, Lucà R, Riccardi MG, Martano M, Borzacchiello G, Esposito I, Roberto S. Bovine papillomavirus type 2

infection and microscopic patterns of urothelial tumours of the urinary bladder in water buffaloes. *BioMed Res Int*. 2013;2013:937918.

Mandigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. *Microbiologia de Brock*. 12. ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2010. 1160 p.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Growth, maintenance, and preservation of bacterial strains In: *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 2nd ed. Melbourne: Editora Cold Spring Harbor Laboratory; 1982. p. 61-2.

Manglenon GA, Doobar J. The biology of papillomavirus latency. *Open Virol J*. 2012;6:190-7.

Marins RSQS, Cassiano KM, Pereira SRFG, Nogueira DM, Carvalho EQ. Canine latent papillomavirus infection and chromosomal instability studies in peripheral blood lymphocytes and tumors cells cultures from lesion biopsy. *Int Res J Biochem Bioinformatics*. 2012;2(3):62-8.

Mariz, FC, Silva, MAR, Jesus ALS, Freitas AC. Reviews of current data about Human papillomavirus vertical transmission. *Clin Infect Dis Advances Access*. 2013;1-20.

Martelli-Marzagão F, Ogawa MM, Tomimori J, Yamashiro AS, Santos-Júnior GF, Porro AM. Caracterização clínica e histopatológica do papilomavírus humano das verrugas vulgaris nos receptores de transplante renal. *Anais Bras Dermatol*. 2010;85(5):743-6.

Martens A, Moor A, Demeulemeester J, Ducatelli R. Histopathological characteristics of five clinical types of equine sarcoid. *Res Vet Sci*. 2000;69:295-300.

Martinez-Outschoorn UE, Curry JM, Ko YH, Linz Z, Tuluc M, Cagnetti D, Birbe RC, Pribitkin E, Bombonati A, Pestell RG, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP Oncogenes and inflammation rewire host energy metabolism in the tumor microenvironment. *Cell Cycle*. 2013;12(16):2580-97.

Mayers C, Frattini MG, Hudson JB, Limins LA. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. *Science*. 1992;257:971-3.

Mazzuchelli-de-Souza J, Carvalho RF, Ruiz RM, Melo TC, Araldi RP, Carvalho E, Thompson CE, Sircili MP, Beçak W, Stocco RC. Expression and in silico analysis of the recombinant bovine papillomavirus E6 protein as a model for viral oncoproteins studies. *BioMed Res Int*. 2013;2013:421398.

Melo TC, Diniz N, Campos SRC, Ferraz OP, Lindsey CJ, Riegger TT, Beçak W, Stocco RC. Cytogenetic studies in peripheral blood of bovines afflicted by papillomatosis. *Vet Comp Oncol*. 2011;9(4):269-74.

_____, Carvalho RF, Mazzuchelli-de-Souza J, Diniz N, Vasconcelos S, Assaf SLMR, Araldi RP, Ruiz RM, Kerkis I, Beçak W, Stocco RC. Phylogenetic classification and clinical aspects of a new putative Deltapapillomavirus associated with skin lesions in cattle. *Genet Mol Res*. 2014;13(2):2458-69.

McBride AA, Dlugosz A, Baker CC. Production of infectious bovine papillomavirus from cloned viral DNA by using an organotypic raft/xenograft technique. *PNAS*. 2000;97(10): 5534-9.

McBride AA, Sakakibara N, Stepp WH, Jang MK. Hitchhiking on host chromatin: how papillomaviruses persist. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819(7):820-5.

McKelvy-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, Méo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat Res*. 1993;288(1):47-63.

Meselson M, Stahl FW, Vinograd J. Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1957;43(7):581-8.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2014. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso 04 jun 2014.

Miyamae Y, Yamamoto M, Sasaki YF, Kobayashi H, Sgarashi-Soga M, Shimoi K, Hayashi M. Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the in vivo single cell gel electrophoresis (comet) assay: a collaborative study by five laboratories. *Mutat Res*. 1998;418(2-3):131-40.

Monte TCC, Peixoto GL. A incidência de papilomavírus humano em mulheres no Hospital Universitário Sul Fluminense. *RBAC*. 2010;42(2):132-9.

Monteiro VLC, Coelho MCOC, Carneiro AS, Silva RFAA, Teixeira MN, Wanderley AG, Wanderley EK, Franco ES. Descrição clínica e histopatológica da papilomatose cutânea bovina (BPV). *Ciência Animal Brasileira*. 2008;9(4):1079-88.

Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature*. 2010;10:550-60.

Moreno EF, Carmona JM, Ferreira ESV, Figueiras NB, Bonilla RS, Puente HF, Ollarzabal ALM. Atlas: anatomía topográfica. Havana: Editora Universitaria. Ciudad de La Habana; 2009. 51 p.

Motlitsy AG, Motlitsy MN. The chemical nature of keratohyalin granules of the epidermis. *J Cell Biol*. 1970;47:593-603.

Moura JW, Stocco dos Santos RC, Dagli MLZ, D'Angelino JL, Birgel EH, Beçak W. Chromosome aberrations in cattle raised on bracken fern pasture. *Experientia*. 1988;44:785-9.

Muro LFF, Botteira CRP, Piccinin A. Papilomatose bovina. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 2008; 10. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/jXJkl4XbtkUzDc_2013-5-28-16-2-43.pdf [15 dez 2013].

Nakamura Y, Mashima Y, Kameyama K, Mukai M, Oguchi Y. Detection of human papillomavirus infection in squamous tumours of the conjunctiva and lacrimal sac by immunohistochemistry, in situ hybridization, and polymerase chain reaction. *British J Ophthalmol*. 1997;81:308-13.

Nascimento GA, Souza EVM, Campos-Ferreira DA, Arruda MS, Ekert MHF, Bruneska D, Lima-Filho JL. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. *Biosens Bioelectron.* 2012;38(1):61-6.

Nassir L, Brandt S. Papillomavirus associated diseases of the horse. *Vet Microbiol.* 2013;167(1-2):159-67.

Navarrete MH, Carreira P, Miguel M, Torre C. A fast comet assay variant for solid tissue cells: the assessment of DNA damage in higher plants. *Mutat Res.* 1997;389(2-3):271-7.

Nepon GT. Complexo de histocompatibilidade principal In Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Medicina Interna de Harrison.* 18. ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2013. v.2, 2685-94.

Nicholls PK, Stanley MA. The immunology of animal papillomaviruses. *Vet Immunol Immunopathol.* 2000;73:101-27.

Ogawa T, Tomita Y, Okada M, Shinozaki K, Kubonoya H, Kaiho I, Shirasawa H. Broad-spectrum detection of papillomavirus in bovine teat papillomas and health teat skin. *J Gen Virol.* 2004;85:2191-7.

Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols.* 2006;1:23-29.

Orth G, Favre M, Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J Virol.* 1977;24(1):108-20.

Östling O, Johanson K. Microeletrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;123:291-8.

Özsy SY, Özyildiz Z, Güzel M. Clinical, pathological and immunohistochemical findings of bovine cutaneous papillomatosis. *Üniv Vet Fak Derg.* 2011;58:161-5.

Pacheco JW. Guia técnico ambiental de abates (bovinos e suínos). CETESB; 2006, p. 98. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/tecnologia/producao_limpa/documentos/abate.pdf 15 [dez 2013].

Park M, Kim HJ, Kim H. Optimum conditions for production and purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif.* 2008;59(1):175-81.

Pathania S, Dhama K, Saikumar G, Shahi S, Somvanshi R. Detection and quantification of bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) by real-time PCR in urine and urinary bladder lesions in Enzootic Bovine Haematuria (EBH)-affected cows. *Transbound and Emerg Dis.* 2012;59(1):79-84.

Pereira JMA. Manual de virologia prática. 3. ed. Lisboa: Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2008. 34 p.

Pessoa NSD. Estudos sobre a expressão do Papilomavírus humano (HPV): avaliação comparativa sobre lesões cervicais, sangue periférico e retinoblastoma.[tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Pikart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:503-33.

Plessers E, Pardon B, Deprez P, De Backer P, Croubels S. Acute hemorrhagic syndrome by bracken poisoning in cattle in Belgium. *Vlaams Diergeneeskuding Tydschrift.* 2013;82:31-7.

Potocki L, Lewinska A, Klukowska-Rötzler J, Bielak-Zmijewska A, Grabowska W, Beszutck I, Kaminska P, Roga E, Bugno-Poniewierska M, Slota E, Mählmann K, Kock C, Wnuk M. Sarcoid-derived fibroblasts: link between genomic instability, energy metabolism and senescence. *Biochine.* 2013;1-10.

Rampias T, Sasaki C, Psyrris A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncology.* In press.

Rashad AL, Evans CA. Histologic features of virus-rich and virus-poor Shope papillomas of cottontail-rabbits. *Cancer Res.* 1967;27:1855-60.

Rector A, Van Ranst M. Animal papillomaviruses. *Virology.* 2013;445:213-22.

Rivitti SC. *Dermatologia básica.* 3. ed. São Paulo: Livraria Editora Artes Médicas Ltda; 1983. 646 p.

Rivoire WA, Corleta HVE, Brum IS, Capp D. Biologia molecular do câncer cervical. *Ver Bras Saude Metern Infat.* 2006;6(4):447-51.

Rogovskyy AS, Baszler TV, Brodway DS, Brunning DL, Davitt CM, Evermann JF, Burk RD, Chen Z, Mansfield KG, Halderson GJ. A novel papillomavirus isolated from proliferative skin lesions of a wild American beaver (*Castor Canadensis*). *J Vet Diagn Invest.* 2012;24(4):750-4.

Rodríguez-Limas WA, Sekar K, Tyo KE. Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;26(4):1089-93.

Roperto S, Borzacchiello G, Esposito I, Riccardi M, Urraro C, Lucà R, Corteggio A, Tatè 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.* 2007;7(3):1-9.

_____, Brun R, Paolini F, Urraro C, Russo V, Borzacchiello G, Pagni U, Raso C, Rizo C, Roperto F. Detection of Bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumors: possible biological role. *J Gen Virol.* 2008;89:3027-33.

_____, Borzacchiello G, Brun R, Lunardi L, Maiolino P, Martano M, Paciello O, Papparella S, Restucci B, Russo V, Salvatori G, Urraro C, Roperto F. A review of bovine urothelial tumours and tumor-like lesions of urinary bladder. *J Comp Pathol.* 2010;142:95-108.

_____, Comazzi S, Ciusani E, Paolini F, Borzacchiello G, Esposito I, Lucà R, Russo V, Urraro C, Venutti A, Roberto F. PBMCs are additional sites of productive infection of bovine papillomavirus type 2. *J Gen Virol*. 2011;92:1787-94.

Russo CAM, Voloch CM, Schrogo CG. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos In Martioli SR, Fernandes FMC. *Biologia molecular e evolução*. 2. ed. Ribeirão Preto: Editora Holos – Sociedade Brasileira de Genética; 2012. p.157-64.

Salvarasu S, Ow DSW, Lee SY, Lee MM, Oh SKW, Karimi IA, Lee DY. Characterizing *Escherichia coli* DH5 α growth and metabolism in a complex medium using genome-scale flux analysis. *Biotechnol Bioengin*. 2009;12(3):923-34.

Schwarz KB. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(5):641-9.

Seiden MV. Cânceres ginecológicos In: Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Medicina interna de Harrison*. 18. ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2013. p. 810-6.

Singh NP, Stephens RE, Schneider EL. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Rad Biol*. 1993;66:23-8.

Silva MAR, Carvalho CCR, Coutinho LCA, Reis MC, Aragão-Batista MV, Castro RS, Anjos FBR, Freitas AC. Co-infection of bovine papillomavirus and feline-associated papillomavirus in bovine cutaneous warts. *Transbound Emerg Dis*. 2012;59(6):539-43.

_____, Silva, K.M.G., Jesus, A.L.S., Barros, L.O., Corteggio, A., Altamura, G., Borzacchiello, G., Freitas, A.C. The presence and gene expression. Of bovine papillomavirus in the peripheral blood and semen of health horses. *Transbound Emerg Dis*. 2012.

_____, De Albuquerque BMF, Pontes NE, Coutinho LCA, Leitão MCG, Reis MC, Castro RS, Freitas AC. Detection and expression of Bovine papillomavirus in blood of healthy and papillomatosis affected cattle. *GMR*. 2013;12(3):3150-6.

_____, Batista MVA, Pontes NE, Santos EUD, Coutinho LCA, Castros RS, Balbino VQ, Freitas AC. Comparison of two PCR strategies for the detection of bovine papillomavirus. *J Virol Methods*. 2013;192:55-8.

Shafiti-Keramat S, Handisurya A, Kriehuber E, Meneguzzi G, Slupetzky K, Kirnbauer R. Different heparina sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomavirus. *J Virol*. 2003;77(24):13125-35.

_____, Schellenbacher C, Handisurya A, Christensen N, Reininger B, Brandt S, Kirnbauer R. Bovine papillomavirus type 1 (BPV1) and BPV2 are closely related serotypes. *Virol*. 2009;393:1-6.

Shamanna RA, Hoqui M, Pe'ery T, Mathews MB. Induction of p53, p21 and apoptosis by silencing the NF90/NF45 complex in cervical carcinoma cells. *Oncogene*. 2012;32(43): 5176-85.

Schwiger MR, You J, Howley PM. Bromodomain protein 4 mediates the papillomavirus E2 transcriptional activation function. *J Virol*. 2006;80(9):4276-85.

Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits. *J Exp Med*. 1933;58(5):607-24.

Shulman FY, Krafft AE, Janczewski T. Feline cutaneous fibropapillomas: Clinicopathologic findings and association with papillomavirus infection. *Vet Pathol*. 2001;38(3):291-6.

Shulman FY, Krafft AE, Janczewski T, Reupert R, Jackson K, Garner MM. Camelid mucocutaneous fibropapillomas: Clinicopathologic findings and association with papillomavirus. *Vet Pathol*. 2003;40(1):103-7.

Sousa NLA, Alves RRF, Martins MR, Barros NKS, Ribeiro AA, Zeferino LC, Dulfloth RM, Rabelo-Santos SH. Cytopathic effects of human papillomavirus infection and the severity of cervical intraepithelial neoplasias: a frequency study. *Diagn Cytopathol*. 2011;40(10):871-5.

Speir JA, Munshi S, Wang G, Baker TE, Johnson JE. Structures of the native and swollen forms of Cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure*. 1995;3(1):63-78.

Stocco dos Santos RC, Lindsey CL, Ferraz OP, Pinto JR, Mirandola RS, Benesi FJ, Birgel EH, Pereira CAB, Beçak W. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *J Gen Virol*. 1998;79:2127-35.

Talbert-Slagle K, Dimasi D. The Bovine papillomavirus E5 protein and the PDGF β receptor: it takes two to tango. *Virol*. 2009;384(2):345-51.

Tan MJA, White EA, Sowa ME, Harper JW, Aster J, Howley PM. Cutaneous β -human papillomavirus E6 proteins bind mastermind-like coactivators and repress Notch signaling. *PNAS*. 2012;109(23):E1473-80.

Tan MT, Yildirin Y, Sozmen M, Bilge-Dagalp S, Yilmaz V, Kirmizigul AH, Gokce E. A histopathological, immunohistochemical and molecular study of cutaneous bovine papillomatosis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2012;19(5):739-44.

Teifke JP, Kidney BA, Löhr C, Yager JA. Detection of papillomavirus-DNA in mesenchymal tumor cells and not in the hyperplastic epithelium of feline sarcoid. *Vet Dermatol*. 2003;14:47-56.

Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BJ, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*. 1992;13:718-25.

Tobar AC, Faz EM, Murillo V, Veja V. Reporte de casos de hematuria enzoótica bovina por ingestión de *Pteridium arachnoideum* en la región ganadera de San Miguel Bolívar, Provincia Bolívar, Ecuador. *Revista de Salud Animal*. 2011;33(3):197-202.

Toledo S. Citogenética dos tumores sólidos. In: Maluf SW, Riegel M. et al. *Citogenética Humana*. Porto Alegre: Editora Artmed; 2011. p. 252-7.

Tomita Y, Ogawa T, Jin Z, Shirasawa H. Genus specific features of bovine papillomavirus E6, E6, E5 and E8 protein. *Virus Res.* 2007;124:231-6.

Trus BL, Roden RBS, Greenstone HL, Vrhel M, Schiller JT, Booy FR. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a threedimensional reconstruction to 9Å resolution. *Nature Structural Biology.* 1997;4(5):413-20.

Tsai TC, Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *Arch Virol.* 2003;148:1445-53.

Turk N, Zupancić Z, Starisina V, Kovac S, Babic T, Kriszinger M, Curic S, Barbic L, Milas Z. Severe bovine papillomatosis: detection of bovine papillomavirus in tumor tissue and efficacy of treatment using autogenous vaccine and paraimmunity inducer. *Veterinarski Arch.* 2005;75(5):391-7.

Vanslyke JK, Lee P, Wilson EM, Hruby DE. Isolation and analysis of Vaccinia virus previrions. *Virus Genes.* 1993;7(4):311-24.

Velazquez EF, Chaux A, Cubilla A.L. Histologic classification of penile intraepithelial neoplasia. *Seminars in Diagnostic Pathology.* 2012;29:96-102.

Velloso MAL, Abreu IN, Mazzafera P. Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasilense* Choisy crescendo in vitro. *Acta Amazonica.* 2009;39(2):267-72.

Vicari CAF. Avaliação de método para a identificação dos vírus do papiloma bovino. [Dissertação (Mestrado em Ciências)]. São Paulo, SP. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) – Programa de Pós-graduação em Morfologia; 2011. p.74.

Waldeck W, Rösl F, Zentgraf H. Origin of replication in episomal bovine papillomavirus type 1 DNA isolated from transformed cells. *EMBO J.* 1984;3(9):2173-8.

Wang F, Kielf E. Virologia Médica In Longo DL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Jameson JL, Loscalzo J. *Medicina Interna de Harrison.* 18. ed. Porto Alegre: Editora Artmed; 2013. p.1432-41.

Wang R, Wang J, Li J, Wang Y, Xi Z, An L. Comparison of two gel filtration chromatographic methods for the purification of Lily symptomless virus. *J Virol Methods.* 2007;139:125-31.

Wang JW, Roden RBS. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology.* 2013;445:175-86.

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Reação da Polimerase em Cadeia In: *O DNA Recombinante.* 2. ed. Ouro Preto: Editora UFOP; 1997. p.646.

White EA, Howley PM. Proteomic approaches to the study of papillomavirus-host interactions. *Virol.* 2013;453:57-69.

Willians JH, Dyk E, Nel PJ, Lane E, Wilpe EV, Bengis RG, Klurk-Lorist LM, Heerden J, Tydsker S. Pathology and immunohistochemistry of papillomavirus-associated cutaneous lesions

in Cape mountain zebra, giraffe, sable antelope and African buffalo in South Africa. *Afr Vet Ver.* 2011;82(2):97-106.

Witte I, Plappert U, Wall H, Hatmann A. Genetic Toxicity Assessment: Employing the Best Science for human safety evaluation Part III: The Comet Assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. *Toxicol Science.* 2007;97(1):21-6.

Wobeser BK, Hill JE, Jackson ML, Kidney BA, Mayer MN, Townsend HGC, Allen AL. Localization of Bovine papillomavirus in equine sarcoids and inflammatory skin conditions of horses using laser microdissection and two forms of DNA amplification. *J Vet Diagn Invest.* 2012;24(1):32-41.

Wosiack SR, Reis ACF, Alfieri AF. Papilomavírus bovino tipo 2 na etiologia da hematúria enzoótica bovina. *Semina: Ciências Agrárias.* 2002;23(1):121-30.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin-kinase. *Nature.* 1993;366:701-4.

Yagui A, Carvalho C, Freitas AC, Góes LGB, Dagli MLZ, Birgel JR EH, Beçak W, Stocco RC. Papillomatosis in cattle: in situ detection of bovine papillomavirus DNA sequences in reproductive tissues. *Braz J Morpho Sci.* 2006;23(3-4):525-9.

You J. Papillomavirus interaction with cellular chromatin. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1799(3-4):192-9.

Yuryev A. PCR Primer Design. *Methods Mol Biol.* Totowa: Ed. Humana Press; 2007. 446 p.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 2000;7(1-2):203-14.

Zheng YZ, Webb R, Greenfield PF, Reid S. Improved method for counting virus and virus like particle. *J Virol Methods.* 1996;62:153-69.

Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006;11:2286-302.

Zhou J, Gissmann L, Zentgraf H, Müller H, Picken M, Müller M. Early phase in the infection of cultured cells with papillomavirus virions. *Virology.* 1995;214:167-76.

Zhu W, Dang J, Shimizu E, Hatama S, Kadota K, Goto Y, Haga T. Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. *Arch Virol.* 2012;157:85-91.

Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc Assoc Am Physiscians.* 1999;111(6):581-7.

APÊNDICE A – Resultados dos Diagnósticos

Amostras coletadas de 50 bovinos adultos de ambos os sexos, indicando a localização de origem dos papilomas, as relações de absorvância (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) e concentração de DNA, em ng/ μ L, obtidos após a extração e o tipo viral, seguido dos valores da matriz de identidade e o número da sequência do GenBank usado na comparação de identidade através do programa BLAST.

Bovino	Sexo	Nascimento	Amostra	Região	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	[DNA] ng/ μ L	Tipo Viral	Identidade	Nº acesso GenBank
1	F	21/04/11	1	Nasal	1,33	0,39	35,0	BPV-2	97%	X01768.1
			2	Nasal	1,03	0,26	38,0	BPV-2	96%	X01768.1
			3	Nasal	1,08	0,24	43,0	BPV-2	98%	X01768.1
			4	Pescoço	1,39	0,28	28,0	BPV-3	95%	AF486184.1
2	M	23/07/11	5	Prega ventral do pescoço	1,16	0,32	34,0	BPV-2	92%	X01768.1
3	M	04/10/11	6	Prega ventral do pescoço	1,12	0,40	21,0	BPV-2	75%	X01768.1
			7	Prega ventral do pescoço	1,29	0,50	30,0	BPV-2	72%	X01768.1
			8	Prega ventral do pescoço	1,85	0,64	28,0	BPV-9	77%	AB331650.1
4	F	29/11/11	9	Pescoço	1,12	0,40	36,0	BPV-2	95%	X01768.1
5	F	25/04/11	10	Orbital	1,13	0,78	39,0	BPV-2	98%	X01768.1
			11	Orelha	1,70	1,46	213,0	BPV-2	98%	AB23006.1
6	F	26/09/11	12	Orbital	1,76	1,47	269,0	BPV-2	97%	X01768.1
			13	Prega ventral do pescoço	1,35	1,02	132,0	BPV-2	96%	X01768.1
			14	Prega ventral do pescoço	1,45	1,13	98,0	BPV-2	98%	X01768.1
7	F	29/11/11	15	Orbital	1,76	1,47	269,0	BPV-2	97%	X01768.1
			16	Pescoço	1,76	1,02	95,0	BPV-2	98%	X01768.1
			17	Dorsal	2,00	0,71	61,00	BPV-2	95%	X01768.1
			18	Pescoço	1,43	0,57	59,0	BPV-2	94%	X01768.1
			19	Orelha	1,84	1,38	87,0	BPV-2	96%	X01768.1
			20	Prega ventral do pescoço	1,85	1,12	56,0	BPV-2	98%	X01768.1

			21	Pescoço	2,13	1,87	59,0	BPV-2	97%	X01768.1
			22	Orbital	1,87	1,15	79,0	BPV-2	98%	X01768.1
			23	Frontal	1,60	0,68	32,0	BPV-2	98%	X01768.1
8	F	11/02/11	24	Dorsal	1,69	1,56	40,0	BPV-2	98%	X01768.1
			25	Nasal	1,76	1,75	82,0	BPV-2	97%	X01768.1
			26	Dorsal	1,68	1,23	65,0	BPV-2	96%	X01768.1
9	F	05/04/2010	27	Nasal	0,99	0,28	105,0	BPV-2	97%	X01768.1
			28	Orbital	1,73	1,01	44,0	BPV-2	92%	X01768.1
			29	Nasal	-	0,50	5,0	BPV-2	94%	X01768.1
			30	Orbital	1,72	1,12	102,0	BPV-2	93%	X01768.1
10	F	12/05/2010	31	Nasal	1,57	1,34	85,0	BPV-2	97%	X01768.1
			32	Nasal	1,72	1,23	78,0	BPV-2	95%	X01768.1
			33	Nasal	1,56	1,39	134,0	BPV-2	96%	X01768.1
			34	Nasal	1,67	1,21	102,0	BPV-2	95%	X01768.1
11	M	21/11/2010	35	Nasal	1,06	0,55	53,0	BPV-2	94%	AB823006.1
			36	Nasal	1,06	0,55	53,0	BPV-2	94%	AB823006.1
12	F	27/12/10	37	Nasal	1,08	0,52	20,0	BPV-2	94%	X01768.1
			38	Nasal	1,45	0,92	67,0	BPV-2	97%	X01768.1
			39	Nasal	1,54	0,88	55,0	BPV-2	96%	X01768.1
13	F	14/03/2011	40	Pescoço	1,56	0,98	101,0	BPV-2	92%	X01768.1
			41	Pescoço	5,92	1,72	97,0	BPV-2	96%	X01768.1
14	F	15/04/08	42	Tórax	1,71	1,06	62,0	BR/UEL2	90%	EU293538.1
			43	Tórax	1,72	1,21	35,0	BPV-2	92%	X01768.1
			44	Tórax	0,73	1,42	35,0	BPV-2	96%	X01768.1
15	F	11/02/08	45	Tórax	1,34	0,78	29,0	BPV-5	92%	AF457465.1
			46	Tórax	1,32	-	10,0	BPV-2	95%	X01768.1
			47	Tórax	1,01	0,40	72,0	BPV-5	92%	AF457465.1
16	F	05/07/08	48	Tórax	1,41	1,43	49,0	BPV-2	98%	X01768.1
			49	Frontal	1,68	0,98	47,0	BPV-2	95%	X01768.1
17	F	23/04/08	50	Tórax	3,27	2,15	80,0	BPV-2	97%	X01768.1
			51	Tórax	2,87	0,68	69,0	BPV-2	96%	X01768.1

			52	Tórax	1,28	1,26	43,0	BPV-2	94%	X01768.1
18	F	14/05/08	53	Tórax	1,69	1,69	135,0	BPV-2	94%	X01768.1
			54	Tórax	1,45	0,98	102,0	BPV-2	93%	X01768.1
19	F	02/02/08	55	Nasal	1,73	2,01	221,0	BPV-2	96%	X01768.1
			56	Nasal	1,83	2,27	442,0	BPV-2	90%	X01768.1
			57	Prega ventral do pescoço	1,71	1,84	174,0	BPV-2	93%	X01768.1
			58	Nasal	1,47	0,73	48,0	BPV-2	95%	X01768.1
			59	Nasal	2,78	1,89	28,0	BPV-2	96%	X01768.1
20	F	23/06/08	60	Orelha	2,92	0,53	182,0	BPV-2	98%	X01768.1
			61	Nasal	1,50	1,61	54,0	BPV-2	97%	X01768.1
			62	Nasal	1,71	1,21	56,0	BPV-2	96%	X01768.1
21	M	02/11/08	63	Dorsal	1,59	1,08	95,0	BPV-2	94%	X01768.1
			64	Dorsal	1,33	0,56	88,0	BPV-5	90%	AF457465.1
			65	Dorsal	0,85	0,24	86,0	BPV-2	95%	X01768.1
			66	Dorsal	1,02	0,32	47,0	BPV-5	90%	AF457465.1
			67	Dorsal	1,32	0,80	46,0	BPV-5	90%	AF457465.1
22	F	05/06/10	68	Tórax	0,65	2,96	34,0	BPV-2	96%	X01768.1
			69	Tórax	1,34	0,89	31,0	BPV-2	94%	X01768.1
23	F	26/06/11	70	Tórax	1,67	1,43	143,0	BPV-9	80%	AB331650.1
			71	Tórax	1,71	1,23	123,0	BPV-9	80%	AB331650.1
24	F	16/07/11	72	Nasal	1,08	0,31	48,0	BPV-5	85%	AF457465.1
			73	Nasal	0,94	0,27	28,0	BPV-5	98%	AF457465.1
			74	Nasal	1,23	0,45	32,0	BPV-5	98%	AF457465.1
25	F	25/04/11	75	Nasal	1,24	0,87	49,0	BPV-2	95%	AB823006.1
26	F	07/07/11	76	Nasal	1,71	1,44	201,0	BPV-2	98%	AB23006.1
27	F	09/08/11	77	Dorsal	1,14	0,32	128,0	BPV-5	94%	AJ620206.1

APÊNDICE B – Artigo submetido

A Novel Simple and Versatile Method for the Papillomavirus Isolation Through Ultracentrifugation

R.P.Araldi^{a,b}, D.N.S. Giovanni^{b,c}, T.C.Melo^{a,d}, N. Diniz^a, J. Mazzuchelli-de-Souza^{a,b}, T.A. Sant'Ana^{a,b}, R.F.Carvalho^a, W. Beçak^{a,e}, R.C.Stocco^{a,b*}

^aLaboratório de Genética, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP, Brasil, 05503-900.

^bPrograma de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 2415, Ed. ICB III, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil, 05508-900.

^c Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP, Brasil, 05503-900.

^dPrograma de Pós-graduação em Biologia Estrutural e Funcional, Universidade Federal de São Paulo, Ed. Leitão da Cunha, R. Botucatu, 740, São Paulo, SP, Brasil, 04023-900.

^eDepartamento de Biologia, Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Av. Silvio Américo Sasdelli, 1842, Vila A, Ed. Comercial Lorivo, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, 85866-000.

Email addresses:

R.P. Araldi – rodrigo.araldi@butantan.gov.br

D.N.S. Giovanni – dalton.silva@butantan.gov.br

T.C. Melo – thatianacmelo@yahoo.com.br

N. Diniz – nara.diniz@gmail.com

J. Mazzuchelli-de-Souza – jackmazzuchelli@yahoo.com.br

T.A. Sant'Ana – thalita.a.santana@hotmail.com

R.F. Carvalho – rodsfc@butantan.gov.br

W. Beçak – wbecak@pq.cnpq.br

*Corresponding author: R.C. Stocco

Instituto Butantan, Laboratório de Genética

Av. Vital Brasil, 1500 – Butantã – São Paulo, SP – Brasil

Zipcode: 05503-900

Phone number: 55 11 2627-9701; Fax: 55 11 2627-9701

E-mail address: rita.stocco@butantan.gov.br

ABSTRACT

The bovine papillomavirus (BPV) is the etiological agent of bovine papillomatosis, which causes significant economic losses to livestock, characterized by the presence of papillomas that regress spontaneously or persist and progress to malignancy. Currently, there are 13 types of BPVs described in the literature as well as 32 putative new types. In this scenario, this study aimed to isolate viral particles of BPV from skin papillomas, using a novel viral isolation method. The virus types were previously identified with new primers specific designed to detect BPVs. 77 cutaneous papilloma samples of 27 animals, Simmental breed, were surgically removed. The DNA was extracted and subjected to PCR using *Delta-Epsilon* and *Xi* primers. The bands were purified and sequenced. The sequences were analyzed using software and compared to the GenBank database, by BLAST tool. The viral typing showed a prevalence of BPV-2 in 81.81% of samples. It was also detected the presence of the putative new virus type BR/UEL2 in one sample. Virus isolation was performed by ultracentrifugation in a single density of cesium chloride. The method of virus isolation is less laborious than those previously described, allowing the isolation of complete virus particles of BPV-2.

Keyword: Bovine papillomavirus; diagnosis; virus isolation; ultracentrifugation

1. INTRODUCTION

Papillomaviruses are oncogenic viruses with double-stranded circular DNA genome, not coiled, approximately 8Kb long and a 55-60nm diameter. The group is included in the *Papillomaviridae* family, which displays tropism for squamous epithelial and mucous tissues. These viruses affect vertebrates, including human (Alberti et al., 2010), associated with benign and malignant epithelial lesions (Stocco dos Santos et al., 1998; Roperto et al., 2008; Carvalho et al., 2013).

According to the International Committee on Virus Taxonomy (<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>) Papillomaviruses are classified into 30 genera in accordance with the diversity of nucleotide sequences of the L1 Open Reading Frame (ORF). Over 10% differences between two DNA sequences of the L1 ORF define a new virus type, while differences between 2 and 10% define a new viral subtype (de Villiers et al., 2004).

Specifically in bovines, currently, there are 13 types of Bovine Papillomaviruses (BPV) described in the literature, although this number may be greater than 20 (Lunardi et al., 2013). BPV types are classified into three genera, based on homology to the genomic regions of the L1 ORF, the most conserved sequence (de Villiers et al., 2004; de Villiers, 2013): *Deltapapillomavirus* (BPV-1, 2 and 13), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 and 8) *Xipapillomavirus* (BPV-3, 4, 6, 9, 10, 11 and 12) and BPV-7 that remains not included in any genre (Araldi et al., 2013).

The BPV icosahedral capsid has 360 copies of the L1 protein of 55KDa, organized in 72 capsomers and approximately 12 copies of the L2 protein with 39KDa (Góes et al., 2008; Roperto et al., 2008), having a molecular weight of 5.2×10^6 Da (Orth et al., 1977). The BPV genome is divided into three regions: early, late and long control, separated by two polyadenylation sites (Zheng, ZM, Baker, 2006; Borzacchiello, 2007) and the viral DNA is associated with histone-like proteins (Leto et al., 2011). The early control region (ECR) occupies 50% of the viral genome and encodes the proteins E1, E2, E4, E5, E6 and E7. The late control region (LCR) occupies 40% of the genome and encodes the L1 and L2 proteins. The not coding region (NCR) occupies 10% of the genome, with approximately 850bp and,

although it is not coding, it contains the origin of replication (*ori*) and the binding sites for multiple transcription factors, important for the regulation of RNA polymerase II (Zheng, ZM, Baker, 2006; Borzacchiello, 2007; Bocaneti et al., 2014).

The Bovine papillomavirus (BPV) is the etiologic agent of bovine papillomatosis, an infectious disease, clinically characterized by the presence of hyperproliferative lesions (papillomas), causing significant economic losses to the livestock (Carvalho et al., 2003; Carvalho et al., 2013). The infection can result in obstruction of the teat, hindering the hygiene, mastitis, bleeding of teats and difficulty in placing the mechanical milking. Other than that, it is associated with economic depreciation of animal leather (Catroxo et al., 2013). The virus also can cause bladder and esophagus cancer in bovines and its presence has been detected in peripheral blood (Stocco dos Santos et al., 1998; Freitas et al., 2003; Araldi et al., 2013; Campos et al., 2013). The BPV can also cause sarcomas in equines (Martens et al., 2000; Wobeser et al., 2012). Although considered specie-specific, BPV-1 and 2 can affect horses, mules, zebras and buffaloes (Schulman et al., 2003; Löhrdr et al., 2005; Bocaneti et al., 2014).

The BPV infection begins in a micro-tissue lesion, which exposes the peptidoglycans of heparan sulfate (Hartl et al., 2011; McBride et al., 2012). The BPV binds to heparan sulfate in cytoplasmatic membrane of the epithelium cell from the basal layer. In this process the virus particles are internalized through endocytosis, mediated by clathrin and caveolin (Hartl et al., 2011; McBride et al., 2012).

After cell infection, BPV reproductive cycle occurs through: (1) the formation of low-copy viral genome, (2) the maintenance of replication and (3) amplification of differentiated vegetative cells (McBride et al., 2012). So, the reproductive virus cycle depends of epithelial cell differentiation, which justifies the absence of a system for *in vitro* replication (Shafti-Keramat et al., 2003; de Villiers, 2013).

Considering the huge size of the national cattle herd and the significant economic losses due to BPV related diseases, the development of vaccine strategies is very relevant (Mazzuchelli-Souza et al., 2013).

Purification of virions is essential to obtain information about virus chemical, physical, biochemical and biological properties and to reach the production of antiserum (Ali and Roossinck, 2007).

The greatest difficulties in vaccine strategies against papillomavirus (PV) is the viral isolation of a particular viral type (Kirnbauer and Chandrachud, 1996), since the co-infection is frequently observed (Lindsey et al., 2009; Araldi et al., 2013). However, as far as we concerned, there is no *in vitro* PV replication system described (Kirnbauer and Chandrachud, 1996), and PV is not cultivable (Favre et al., 1974).

There are several methods for BPV isolation described in the literature, all based on ultracentrifugation in cesium chloride (CsCl) gradients (Bujard, 1967; Larsen et al., 1987; Löhrdr et al., 2005) or sucrose gradients (Favre, 1975; Liu et al., 1997). However, the published methodologies to date are laborious and involve complicated procedures to obtain sufficient amounts of virions after ultracentrifugation (Bujard, 1967; Wang et al., 2007).

This study shows a novel method for the isolation of BPV virions involving ultracentrifugation, which allows isolating viral particles from monoviral cutaneous papillomas samples. The methodology proposed in this work can be used for isolation of other Papillomaviruses, including the Human papillomavirus (HPV).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Surgically obtained samples

77 samples were collected of cutaneous papillomas from 27 adult bovines (*Bos taurus*) at an experimental farm. Surgical procedures were performed by a veterinarian, using aseptic methods: local anesthesia (lidocaine 2%) incision with sterile bistouries, and sutured with synthetic 3.0 mononylon. The protocol was approved by the Ethic Committee on Animal Use.

The samples were transported in coolers at 4°C and a fragment of approximately 25mg of each sample were destined to molecular type identification.

2.2. DNA Extraction and BPV Identification

The DNA extraction was performed using the PureLink™ Genomic DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer instruction, using 25mg of tissue. The extracted DNA was quantified in spectrophotometer BioPhotometer Plus (Eppendorf, Hamburg, Germany). It was also determined the ratio A260/A280 and A260/A230 to evaluate the DNA extraction quality.

The DNA quality was verified through PCR, using the primer for bovine β -globin (forward 5'-AACCTCTTTGTTTCACAAAGAG-3' and reverse 5'-CAGATGCTTAACCCACTGAGC-3'), according to Yagui et al. (2008). PCR Parameters: the reactions were performed in a total volume of 25 μ l, using: 12.5 μ l of Master Mix (Promega®, Madison, USA), 5.5 μ l of free water nuclease, 1 μ l of forward primer, 1 μ l of reverse primer and 5 μ l of the DNA template. Reactions were performed in the thermocycler Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapore) and subjected to the following cycles: an initial step of three minutes at 94°C, 35 cycles with 50 seconds at 94°C (denaturation), 60 seconds at 60°C (annealing) and 60 seconds 72°C (extension) and a final step of 5 minutes at 72°C.

The amplicons were analyzed in 2% agarose gel in TAE buffer, stained with 2.0 μ l of GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, USA)/100ml of agarose solution. The electrophoretic run was performed at 100V, 400mA for 120 minutes, with the 100bp DNA ladder marker (Invitrogen, Carlsbad, USA). The gel was visualized under transilluminator MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalem, Israel) and images were captured using the software GelCapture 7.1 (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalem, Israel).

2.3. Viral identification through sequencing

The viral identification was performed using a pair of degenerated primers *Delta-Epsilon* (forward 5' – CCAGAYTAYYTMAAAATGGC – 3' and reverse 5' – ATAAMKGCTAGCTTATATTC – 3') and *Xi* (forward 5' – TWYAATAGDCCVTTTGGAT – 3' and reverse 5' – TTMCGCCTACGCTTTGGCGC – 3'), originally designed based on homology of sequences of BPVs, allowing to detect BPVs of genera *Delta*, *Epsilonpapillomavirus* (*Delta-Epsilon*) and *Xipapillomavirus* (*Xi*). The primers amplify the L1 ORF, resulting in products with 430 bp and 600 bp, respectively. These primer pairs were designed based on Maeda et al., (2007).

To test the specificity of both primers to detect BPV according to the genera, they were tested firstly in cloned genomes of BPV-1 (AB626705), BPV-2 (M20219.1), BPV-3 (AF486184.1), BPV-4 (X05817.1), BPV-5 (NC004195.1) and BPV-6 (AB845589.1).

PCR parameters: reactions were performed in a total volume of 50.0µl, using: 25.0µl of Master Mix (Promega®, Madison, USA), 11.0µl of nuclease free water, 2.0µl of the forward and 2.0µl of the reverse primer and 10.0 µl of DNA template. Reactions were done on the thermocycler Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Singapore), and subjected to the following cycles: an initial step of 10 minutes at 94°C, 35 cycles with 60 seconds at 94°C (denaturation), 60 seconds at 52°C (annealing), 60 seconds and 72°C (extension) and 10 minutes at 72°C (final step). The amplicons were analyzed in previously described conditions, with positive and negative controls. As positive control, BPV2 viral genome for *Delta-Epsilon* primer and BPV-3 for *Xi* primer, previously cloned in bacterial vector pAT153 in *Escherichia coli* D5Hα strain were selected.

The amplicon bands were purified using the PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen®, Carlsbad, USA), according to the manufacturer instructions and, after eluted, the material was stored at -20°C. The sequencing reactions were subjected to sequencing on ABI PRISM 3730 DNA Analyzer™ (Applied Biosystems), using the BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), employing 2.5 µl of the respective primer at 5 pM.

The quality of the DNA sequences were checked and overlapping fragments were mounted using the bioinformatics software BioEdit version 7.0.9.0 (Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA) and the sequences were compared using the NCBI database, through the BLAST tool (<http://blast.ncbi.nlm.gov>).

2.4. Isolation of BPV virions

After the molecular identification of BPV types, 40g of papilloma samples with only one viral type were mechanically macerated for two minutes with 320 ml of lyses buffer (1M NaCl, 0.02M PBS pH 8.0). The product was transferred to cellulose nitrate tubes and was centrifuged for 30 minutes at 7,100rpm in Sorvall OTD-75 Ultracentrifuge, using the AH-629 (36 ml) swinging rotor, at 4°C for a first clearance. The supernatant, containing the virus particles, was collected and stored. The resulting pellets were suspended in 320 ml of lyses buffer and centrifuged again under the above conditions for the enrichment of virus extraction. The supernatants were combined and added of 0.25% of UltraPure™ SDS (Invitrogen®, Carlsbad, USA) and 0.01% trypsin 1:250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)/MiliQ autoclaved water. The final volume was incubated along two hours at 37°C in a shaker, under rotation of 250rpm. After incubation, the material was centrifuged for one hour at 23,600rpm in a Sorvall AH-629 (36 ml) swinging rotor at 4°C, discarding the supernatant. The pellet, consisting mainly of collagen fibers, was suspended in 2 mg/ml collagenase solution in lyses buffer, resulting in a final volume of 5 ml. The suspension was incubated for four hours at 37°C in a shaker, under rotation of 300rpm.

The suspension was centrifuged for one hour at 29,100 rpm in Sorvall AH-650 swinging rotor in cellulose nitrate tubes of 5 ml, discarding the supernatant. The pellet was suspended in 400µl suspension buffer (0.05M NaCl, 0.01M EDTA, 0.05M PBS pH 7.4).

The final volume of 400µl of viral suspension was transferred to cellulose nitrate tubes containing of 5 ml, containing 4 ml of a solution of CsCl (density of 1.3 g/ml) in suspension buffer. The tubes were centrifuged along 24 hours at 34,000rpm in Sorvall AH-650 (36 ml) swinging rotor. After ultracentrifugation, the BPV virions were collected by aspiration and transferred to cryogenic tubes that had their volume completed to 2 ml of PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) and stored at -80°C.

An aliquot of 500 µl of isolated virions was destined to electronic transmission microscopy, being fixed in glutaraldehyde buffer at 2%, dehydrated in ethanol, submitted a negative staining and included in epoxy resin. The material was analyzed in electronic transmission microscopy Leo 906E (Carls Zeiss, Germany) and the images were captured by Mega View III camera and using the software ITEM version E 23082007 (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany, GmbH), employing a voltage of 80 kV and a constant current of 1 A and a total magnification of 60,000 to 120,000X.

3. RESULTS

3.1.Molecular Identification and typifying of BPV

The *Delta-Epsilon* and *Xi* primers showed detection specificity for the different BPVs genera, according to figure 1. Using the designed primers and sequencing, it was possible identify the presence of BPV-2 in 81.82% of samples (63/77), being the most prevalent virus type. It was detected the presence of BPV-5 in 11.68% of samples (9/77), BPV-9 in 3.89% (3/77). The results also point out the presence of BPV-3 and the putative virus type BR/UEL-2 in one sample each, being the first description of this putative virus type in São Paulo State, Brazil. It was also observed the co-infection for more than one virus type in five animals, representing 18.51% of analyzed animals.

3.2.Virus Isolation

Using the novel methodology proposed in this present work, it was successfully achieved the isolation of complete BPV-2 virions. Although the molecular typifying had showed the presence of four different types of BPV (BPV-2, 3, 5 and 9) and a putative new type (BR/UEL-2), we only isolated BPV-2, the most frequent type observed.

To confirm the isolated virus, the material was submitted to electronic transmission microscopy in a maximum magnification of 120,000 X, revealing the efficacy of the novel methodology, indicating the presence of high amount of BPV-2 55 nm diameter particles as expected (figure 2).

The isolated particles of BPV-2 were stocked at -80°C. The novel methodology proposed can be applied with equal success for isolation of another BPVs types as well as for the Human Papillomavirus (HPV), since the methodology allows isolating the virus in accordance with the molecular weight.

4. DISCUSSION

A high frequency of bovine cutaneous papillomatosis was observed in the studied population, especially among young animals aged between two and three years. Similar results in animals of the Simmental breed were observed by Turk et al.(2005). The high

incidence of papillomatosis seem to be related to the confinement of animals, since confined populations are more susceptible to outbreaks of the disease.

Only in Brazil, which has the second highest effective cattle herd in the world, with approximately 210 million of animals, about 60% of the herd is infected by BPV (Stocco dos Santos et al., 1998). This amount may be even higher because the virus infection can be asymptomatic (Araldi et al., 2013), leading to the need of prophylactic and/or therapeutic vaccines.

The viral typing by sequencing requires the use of primers that allow efficient identification of viral sequences. Accordingly, the primer set *Delta-Epsilon* and *Xi* were highly efficient in identifying sequences of BPV in accordance with the virus genera. This is the first description of these primers, which can represent an important advance in epidemiological studies of BPV, facilitating the virus identification.

Viral typing was performed by sequencing, revealing the presence of BPV-2 in 81.81% (63/77) of samples, being the most prevalent virus type in the studied population, followed by the BPV-5, observed in 11.68% (9 /77), BPV-9, detected in 3.89% (3/77) and BPV-3, observed in only one sample. It was also detected the presence of supposed new viral type BR/UEL-2 in one sample.

The BR/UEL-2 was firstly identified in State of Paraná, being observed in skin papilloma of the axilla region (Claus et al., 2009). The virus presents an identity matrix of 78% with the BPV-4, allowing its classification as a *Xipapillomavirus* (Claus et al., 2009).

We detected the BR/UEL-2 in a cutaneous papilloma in the thoracic region of a female animal. This finding points out to the BPV distribution and dissemination for different areas, justifying the need for investment in larger epidemiological studies to understand the different viral types circulating in Brazil and worldwide. In this scenario, our laboratory has identified different virus types and putative new ones of BPV in Brazil (Lindsey et al., 2009; Melo et al., 2014; Araldi *et al.*, in press).

It was observed co-infection in five animals. Although few studies have reported the co-infection, similar results were observed by Lindsey et al.(2009) and Araldi et al.(2013) and Carvalho et al. (2013). The infection with more than one virus type demands investments in vaccines with a broad spectrum of coverage, particularly related to the most prevalent BPVs types (Nicholls and Stanley, 2000).

Although the presence of BPV-2 was the most prevalent in the studied population, the data revealed no clinical signs of chronic enzootic hematuria, suggestive of bladder carcinoma (Roperto et al., 2010; Pathania et al., 2012). This fact can be justified by the absence of fern *Pteridium aquilinum* on the farm. Studies showed that intake of 10-30g/Kg of the fern lead to bone marrow failure, resulting in fever, diathesis, bleeding, thrombocytopenia and neutropenia (Lucena et al., 2011). Although it had not been detected the presence of bladder cancer clinical signs, the presence of the virus should not be neglected, since the BPV causes cytogenetic damage that can lead to malignancy (Stocco dos Santos et al., 1998; Melo et al., 2011; Araldi et al., 2013).

Since the development of ultracentrifugation technique, this has been frequently used for virus isolation of Papillomavirus virions with gradient of cesium chloride (CsCl), plus a cushion of 40% sucrose (Bujard, 1967; Favre, 1975; Baker et al., 1991; Vanslyke et al., 1993; Zhou et al., 1995).

The ultracentrifugation promotes a compression of solutions, resulting in a continuous increase of density of solutions in the direction of centrifugal force (Meselson et al., 1957). This condition allows the isolation of BPV virions, with a buoyant density of 1.34g/ml of CsCl and empty particles (composed only by capsids without genetic material) with a buoyant density of 1.29 g/ml (Lancaster and Olson, 1982).

However, some problems were commonly observed in previous studies involving the BPV isolation, such as the difficulty to concentrate the virion pellet (Karger et al., 1998; Wang et al., 2007), obtaining the gradient of centrifugation and the disruption of capsids due the multiple steps of ultracentrifugation, reducing the number of isolated particles (Favre, 1975; Wang and Roden, 2013).

The use of the methodology presented for us is a result of adaptation of those previously described in the literature, allowed the isolation of BPV-2 satisfactorily. We did not obtain enough samples, in terms of weight, of other types identified in this study (BPV- 3, 5, 9 and BR/UEL2), as the isolation technique requires at least 40 g of papilloma infected with only one virus type.

The results of electronic transmission microscopy revealed the efficacy of the novel methodology to BPV isolation, indicating a high number of viral particles, with approximately 55 nm, which corresponds to the diameter of BPV (figure 1).

The methodology presented in this work showed to be less laborious than that reported in previous studies that employed the use of CsCl gradient plus a cushion of sucrose, while that proved effective in the isolation of BPV virions. Another advantage obtained from the use of this methodology was to obtain a single band, comprising whole virus BPV particles, without forming a second band composed of DNA without viral capsids. The formation of this second band represented one of the difficulties reported in the literature, because it reduces the number of virions isolated (Favre, 1975).

The disruption of the capsids is associated with multiple centrifugation steps employed in the methods already published, since the centrifugal force is a physical denaturing agent (Speir et al., 1995). Moreover, an important change was the replacement of the sarkosyl, an ionic surfactant derived from sarcosine by sodium dodecyl sulfate (SDS). The replacement was done in view of their similar properties and their relatively close molecular weights, being 293.38 g/mol of the sarkosyl and 288.38 g/mol of the SDS.

The methodology proposed in this present work can be used with equal success for isolation of another papillomaviruses, including the HPV. Under this view, the isolation of specific types of BPV is critical to immune challenge, allowing the validation of vaccine products through *in vivo* assays and the guarantee of the immunogenic efficacy of candidate products to entrance into a market.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank to the Ministério de Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (#554816/2006-7 and #402539/2011-7), Fundação Butantan and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support. Martin W. Breuer and Fazenda Santa Luzia for their significant cooperation. Carolina da Paz Sabino for her editorial support.

REFERENCES

- Alberti, A., Pirino, S., Pintore, F., Addis, M.F., Chessa, B., Cacciotto, C., Cubeddu, T., Anfossi, A., Benenati, G., Coradduzza, E., Lecis, R., Antuofermo, E., Carcangiu, L., Pittau, M., 2010. *Ovis aries* Papillomavirus 3: a prototype of a novel genus in the family Papillomaviridae associated with ovine squamous cell carcinoma. *Virology* 407, 352–9. doi:10.1016/j.virol.2010.08.034
- Ali, A., Roossinck, M.J., 2007. Rapid and efficient purification of Cowpea chlorotic mottle virus by sucrose cushion ultracentrifugation. *J. Virol. Methods* 141, 84–6. doi:10.1016/j.jviromet.2006.11.038
- Araldi, R.P., Melo, T.C., Diniz, N., Carvalho, R.F., Beçak, W., Stocco, R.C., 2013. Bovine Papillomavirus clastogenic effect analyzed in comet assay. *Biomed Res. Int.* 2013, 1–7.
- Baker, T.S., Newcomb, W.W., Olson, N.H., Cowsert, L.M., Olson, C., Brown, J.C., 1991. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys. J.* 60, 1445–56. doi:10.1016/S0006-3495(91)82181-6
- Bocaneti, F., Altamura, G., Corteggio, a, Velescu, E., Roperto, F., Borzacchiello, G., 2014. Bovine Papillomavirus: New Insights into an Old Disease. *Transbound. Emerg. Dis.* 1–10. doi:10.1111/tbed.12222
- Borzacchiello, G., 2007. Bovine papillomavirus infections in animals. *Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol.* 673–679.
- Bujard, H., 1967. Studies on Circular Deoxyribonucleic Acid. *J. Virol.* 1, 1135–1138.
- Campos, S.R.C., Melo, T.C., Assaf, S., Araldi, R.P., Mazzuchelli-de-Souza, J., Sircili, M.P., Carvalho, R.F., Roperto, F., Beçak, W., Stocco, R.C., 2013. Chromosome aberrations in cells infected with bovine papillomavirus: comparing cutaneous papilloma, esophagus papilloma, and urinary bladder lesion cells. *ISRN Oncol.* 2013, 910849. doi:10.1155/2013/910849
- Campos, S.R.C., Trindade, C., Ferraz, O.P., Giovanni, D.N.S., Lima, a a, Caetano, H.V. a, Carvalho, R.F., Birgel, E.H., Dagli, M.L.Z., Mori, E., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., Beçak, W., Stocco, R.C., 2008. Can established cultured papilloma cells harbor bovine papillomavirus? *Genet. Mol. Res.* 7, 1119–26.
- Carvalho, C.C.R., Batista, M.V. a, Silva, M. a R., Balbino, V.Q., Freitas, a C., 2012. Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 441–7. doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01296.x
- Carvalho, C. De, Freitas, A.C. De, Brunner, O., Pindamonhangaba, F. De, 2003. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of. *Brazilian J. Microbiol.* 34, 82–84.

- Carvalho, R.F., Sakata, S.T., Giovanni, D.N.S., Mori, E., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., Pozzi, C.R., Arcaro, J.R.P., Miranda, M.S., Mazzuchelli-de-Souza, J., Melo, T.C., Comenale, G., Assaf, S.L.M.R., Beçak, W., Stocco, R.C., 2013. Bovine papillomavirus in Brazil: detection of coinfection of unusual types by a PCR-RFLP method. *Biomed Res. Int.* 2013, 270898. doi:10.1155/2013/270898
- Catroxo, M., Martins, A., Petrella, S., Souza, F., Nastari, B., 2013. Ultrastructural Study of Bovine Papillomavirus During Outbreaks in Brazil. *Int. J. Morphol.* 31, 777–784.
- Claus, M.P., Lunardi, M., Alfieri, A.F., Sartori, D., Fungaro, H.P., Alfieri, A.A., P, A.C.M., Lunardi, M., Alfieri, A.F., Sartori, D., Fungaro, M.H.P., 2009. Identification of the recently described new type of bovine papillomavirus (BPV-8) in a Brazilian beef cattle herd 1. *Pesqui. Veterinária Bras.* 29, 25–28.
- De Villiers, E.-M., 2013. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 445, 2–10. doi:10.1016/j.virol.2013.04.023
- De Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T.R., Bernard, H.-U., zur Hausen, H., 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324, 17–27. doi:10.1016/j.virol.2004.03.033
- Favre, M., 1975. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J. Virol.* 15, 1239–47.
- Favre, M., Breitburd, F., Croissanr, O., Orth, G., 1974. Hemagglutinating activity of bovine papilloma virus. *Virology* 578, 572–578.
- Freitas, A.C., Silva, M.A.R., Carvalho, C.C.R., Jr, E.H.B., Santos, J.F., Paulo, U.D.S., Prof, A., Marques, O., Paulo, S., 2007. Papillomavirus DNA detection in non epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus. *Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol.* 697–704.
- Freitas, A.C. De, Carvalho, C. De, Brunner, O., Birgel-junior, E.H., Maria, A., Paiva, M., Benesi, F.J., Gregory, L., Beçak, W., Cassia, R. De, 2003. Viral dna sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Brazilian J. Microbiol.* 34, 76–78.
- Góes, L.G.B., de Freitas, A.C., Ferraz, O.P., Rieger, T.T., Dos Santos, J.F., Pereira, A., Beçak, W., Lindsey, C.J., de Cassia Stocco, R., 2008. Bovine papillomavirus type 4 L1 gene transfection in a Drosophila S2 cell expression system: absence of L1 protein expression. *Braz. J. Microbiol.* 39, 1–4. doi:10.1590/S1517-83822008000100001
- Hartl, B., Hainisch, E.K., Shafiti-Keramat, S., Kirnbauer, R., Corteggio, A., Borzacchiello, G., Tober, R., Kainzbauer, C., Pratscher, B., Brandt, S., 2011. Inoculation of young horses with bovine papillomavirus type 1 virions leads to early infection of PBMCs prior to pseudo-sarcoid formation. *J. Gen. Virol.* 92, 2437–45. doi:10.1099/vir.0.033670-0
- Inglis, S., Shaw, A., Koenig, S., 2006. Chapter 11: HPV vaccines: commercial research & development. *Vaccine* 24 Suppl 3, S3/99–105. doi:10.1016/j.vaccine.2006.05.119

- Karger, a, Bettin, B., Granzow, H., Mettenleiter, T.C., 1998. Simple and rapid purification of alphaherpesviruses by chromatography on a cation exchange membrane. *J. Virol. Methods* 70, 219–24.
- Kirnbauer, R., Chandrachud, L.M., 1996. Virus-like Particles of Bovine Papillomavirus Type 4 in Prophylactic and Therapeutic Immunization. *Virology* 44, 37–44.
- Lancaster, W.D., Olson, C., 1982. Animal papillomaviruses. *Microbiol. Rev.* 46, 191–207.
- Larsen, P.M., Storgaard, L., Fey, S.J., 1987. Proteins present in bovine papillomavirus particles. *J. Virol.* 61, 3596–601.
- Leto, M., Santos-Júnior, G., Porro, A., Tomimori, J., 2011. Human papillomavirus infection : etiopathogenesis , molecular biology and clinical manifestations *. *An. Bras. Dermatologia* 86, 306–317.
- Liu, W.J., Gissmann, L., Sun, X.Y., Kanjanahaluethai, a, Müller, M., Doorbar, J., Zhou, J., 1997. Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions. *Virology* 227, 474–83. doi:10.1006/viro.1996.8348
- Löhrdr, C., Juan-sallésd, C., Rosas-Rosas, A., García, A., Garnerd, M., Teifke, J., 2005. Sarcoids in captive zebras (*Equus burchellii*): Association with bovine papillomavirus type 1 infection. *J. Zoo Wildl. Med.* 36, 74–81.
- Lucena, R.B., Rissi, D.R., Kommers, G.D., Pierezan, F., Oliveira-Filho, J.C., Macêdo, J.T.S. a, Flores, M.M., Barros, C.S.L., 2011. A retrospective study of 586 tumours in Brazilian cattle. *J. Comp. Pathol.* 145, 20–4. doi:10.1016/j.jcpa.2010.11.002
- Lunardi, M., de Alcântara, B.K., Otonel, R.A.A., Rodrigues, W.B., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2013. Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2167–71. doi:10.1128/JCM.00371-13
- Maeda, Y., Shibahara, T., Wada, Y., Kadota, K., Kanno, T., Uchida, I., Hatama, S., 2007. An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. *Vet. Microbiol.* 121, 242–8. doi:10.1016/j.vetmic.2006.12.015
- Martens, a, De Moor, a, Demeulemeester, J., Ducatelle, R., 2000. Histopathological characteristics of five clinical types of equine sarcoid. *Res. Vet. Sci.* 69, 295–300. doi:10.1053/rvsc.2000.0432
- McBride, A. A, Sakakibara, N., Stepp, W.H., Jang, M.K., 2012. Hitchhiking on host chromatin: how papillomaviruses persist. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 820–5. doi:10.1016/j.bbagr.2012.01.011
- Melo, T.C., Diniz, N., Campos, S.R.C., Ferraz, O.P., Lindsey, C.J., Rieger, T.T., Beçak, W., Stocco, R.C., 2011. Cytogenetic studies in peripheral blood of bovines afflicted by papillomatosis. *Vet. Comp. Oncol.* 9, 269–74. doi:10.1111/j.1476-5829.2011.00263.x
- Melo, T.C., Carvalho, R.F., Mazzuchelli-de-Souza, J., Diniz, N., Vasconcelos, S., Assaf, S.L.M.R., Araldi, R.P., Ruiz, R.M., Kerkis, I., Beçak, W., Stocco, R.C., 2014.

- Phylogenetic classification and clinical aspects of a new putative Deltapapillomavirus associated with skin lesions in cattle. *Genet. Mol. Res.* 13(2), 2458-69. doi:10.4238/2014.April.3.18
- Meselson, M., Stahl, F., Vinograd, J., 1957. Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 43, 581–588.
- Nascimento, G. a, Souza, E.V.M., Campos-Ferreira, D.S., Arruda, M.S., Castelletti, C.H.M., Wanderley, M.S.O., Ekert, M.H.F., Bruneska, D., Lima-Filho, J.L., 2012. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. *Biosens. Bioelectron.* 38, 61–6. doi:10.1016/j.bios.2012.04.052
- Nicholls, P.K., Stanley, M.A., 2000. The immunology of animal papillomaviruses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73, 101–127.
- Orth, G., Favre, I.M., Croissant, O., 1977. Characterization of a New Type of Human Papillomavirus That Causes Skin Warts Characterization of a New Type of Human Papillomavirus That Causes Skin Warts. *J. Virol.* 24, 108.
- Pathania, S., Dhama, K., Saikumar, G., Shahi, S., Somvanshi, R., 2012. Detection and quantification of bovine papilloma virus type 2 (BPV-2) by real-time PCR in urine and urinary bladder lesions in enzootic bovine haematuria (EBH)-affected cows. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 79–84. doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01248.x
- Roperto, S., Borzacchiello, G., Brun, R., Leonardi, L., Maiolino, P., Martano, M., Paciello, O., Papparella, S., Restucci, B., Russo, V., Salvatore, G., Urraro, C., Roperto, F., 2010. A review of bovine urothelial tumours and tumour-like lesions of the urinary bladder. *J. Comp. Pathol.* 142, 95–108. doi:10.1016/j.jcpa.2009.08.156
- Roperto, S., Brun, R., Paolini, F., Urraro, C., Russo, V., Borzacchiello, G., Pagnini, U., Raso, C., Rizzo, C., Roperto, F., Venuti, A., 2008. Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: possible biological role. *J. Gen. Virol.* 89, 3027–33. doi:10.1099/vir.0.2008/004457-0
- Schulman, F.Y., Krafft, a. E., Janczewski, T., Reupert, R., Jackson, K., Garner, M.M., 2003. Camelid Mucoutaneous Fibropapillomas: Clinicopathologic Findings and Association with Papillomavirus. *Vet. Pathol.* 40, 103–107. doi:10.1354/vp.40-1-103
- Shafti-keramat, S., Handisurya, A., Meneguzzi, G., Slupetzky, K., Kirnbauer, R., Kriehuber, E., 2003. Different Heparan Sulfate Proteoglycans Serve as Cellular Receptors for Human Papillomaviruses Different Heparan Sulfate Proteoglycans Serve as Cellular Receptors for Human Papillomaviruses. doi:10.1128/JVI.77.24.13125
- Silva, M. a R., De Albuquerque, B.M.F., Pontes, N.E., Coutinho, L.C. a, Leitão, M.C.G., Reis, M.C., Castro, R.S., Freitas, a C., 2013. Detection and expression of bovine papillomavirus in blood of healthy and papillomatosis-affected cattle. *Genet. Mol. Res.* 12, 3150–6. doi:10.4238/2013.February.28.31

- Speir, J. a, Munshi, S., Wang, G., Baker, T.S., Johnson, J.E., 1995. Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. *Structure* 3, 63–78.
- Stocco dos Santos, R.C., Lindsey, C.J., Ferraz, O.P., Pinto, J.R., Mirandola, R.S., Benesi, F.J., Birgel, E.H., Pereira, C. a, Beçak, W., 1998. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 9), 2127–35.
- Turk, N., Župančić, Ž., Starešina, V., Kovač, S., Babić, T., Kreszinger, M., Ćurić, S., Barbić, L., Milas, Z., 2005. Severe bovine papillomatosis : detection of bovine papillomavirus in tumour tissue and efficacy of treatment using autogenous vaccine and parammunity inducer. *Vet. Arh.* 75, 391–397.
- Vanslyke, J.K., Lee, P., Wilson, E.M., Hruby, D.E., 1993. Isolation and analysis of vaccinia virus previrions. *Virus Genes* 7, 311–24.
- Wang, J.W., Roden, R.B.S., 2013. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* 445, 175–86. doi:10.1016/j.virol.2013.04.017
- Wang, R., Wang, J., Li, J., Wang, Y., Xie, Z., An, L., 2007. Comparison of two gel filtration chromatographic methods for the purification of Lily symptomless virus. *J. Virol. Methods* 139, 125–31. doi:10.1016/j.jviromet.2006.09.008
- 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. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 32–41. doi:10.1177/1040638711425952
- Yagui, A., Dagli, M.L.Z., Jr, E.H.B., Reis, B.C.A.A., 2008. Simultaneous presence of bovine papillomavirus and bovine leukemia virus in different bovine tissues : in situ hybridization and cytogenetic analysis. *Genet. Mol. Res.* 7, 487–497.
- Zheng, ZM, Baker, C., 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front. Biosci.* 11, 2286–2302.
- Zhou, J., Gissmann, L., Zentgraf, H., Müller, H., Picken, M., Müller, M., 1995. Early phase in the infection of cultured cells with papillomavirus virions. *Virology* 214, 167–76. doi:10.1006/viro.1995.9943

Figure 1 – Electrophoresis gel: 430 bp amplicons obtained with primer pair *Delta-Epsilon* that is able to amplify BPVs genera *Deltapapillomavirus* (BPV-1 and 2) and *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5) and 600 bp amplicons obtained with primer pair *Xi* in detect BPVs of genre *Xipapillomavirus* (BPV-3, 4 and 6).

Figure 2 – Isolated BPV2 particles from cutaneous papillomas using the proposed methodology in four different magnifications: 16,000 X (A), 36,000 X (B), 75,000 X (C) and 120,000 X (D).

15/5/2014

E-mail de Instituto Butantan - A manuscript number has been assigned: VIRMET-D-14-00191

Rita De Cassia Stocco <rita.stocco@butantan.gov.br>

A manuscript number has been assigned: VIRMET-D-14-00191

Journal of Virological Methods <jmeth@ucl.ac.uk>
 Para: rita.stocco@butantan.gov.br

29 de abril de 2014 10:32

Ms. Ref. No.: VIRMET-D-14-00191
 Title: A Novel Simple and Versatile Method for the Papillomavirus Isolation Through Ultracentrifugation
 Journal of Virological Methods

Dear Dr. R. Stocco,

Your submission entitled "A Novel Simple and Versatile Method for the Papillomavirus Isolation Through Ultracentrifugation" has been assigned the following manuscript number: VIRMET-D-14-00191.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author.
 The URL is <http://ees.elsevier.com/virmet/>.

Your username is: rita.stocco@butantan.gov.br

If you need to retrieve password details, please go to:
http://ees.elsevier.com/virmet/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this Journal.

Kind regards,

Yolander Dimoss
 Central Administrator
 Journal of Virological Methods

 For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.