

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Breno Moacir Farias de Albuquerque

**Aplicação da PCR em Tempo Real Para Detecção,
Tipificação e Carga Viral de *Papilomavírus Bovino***

Recife

2012

Breno Moacir Farias de Albuquerque

**Aplicação da PCR em Tempo Real Para Detecção,
Tipificação e Carga Viral de *Papilomavírus Bovino***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Valdir de Queiroz Balbino

Recife

2012

Albuquerque, Breno Moacir Farias de

Aplicação da PCR em tempo real para detecção, tipificação e carga viral de Papilomavírus bovino/ Breno Moacir Farias de Albuquerque. – Recife: O Autor, 2012.

64 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Valdir de Queiroz Balbino

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Genética, 2012.

Inclui bibliografia

- 1. Papilomavírus 2. Reação em cadeia de polimerase 3. Vírus-genética I. Freitas, Antonio Carlos de (orientador) II. Balbino, Valdir de Queiroz (coorientador) III. Título.**

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-178

Breno Moacir Farias de Albuquerque

**Aplicação da PCR em Tempo Real Para Detecção, Tipificação e
Carga Viral de *Papilomavírus Bovino***

Aprovado em ___/___/___

Banca Examinadora:

**1º Examinador: Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco**

**2º Examinador: Dr. Tercílio Calsa Júnior
Universidade Federal de Pernambuco**

**3º Examinador: Dr. Roberto Soares de Castro
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**1º Suplente: Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**2º Suplente: Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco**

Recife

2012

Aos meus entes queridos e ao criador dedico com
todo amor.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador por ter permitido e acreditado na elaboração desse trabalho, além de ser um grande profissional é uma pessoa bastante compreensiva e sábia, qualidades indispensáveis para liderar um grupo tão extenso e homogêneo nos objetivos.

Agradeço ao grupo de pesquisa do laboratório de bioinformática e evolução biológica, especialmente ao Msc. Marcus Batista por ter desenhado os primers utilizados no trabalho, junto a Msc. Carolina do Amaral.

Aos meus amigos do LGM que mantém esse, um ambiente ímpar de harmonia e alegria.

Agradeço especialmente aos amigos Andre de Jesus, Angélica Ramos, Carolina Amaral, Eliane Coimbra e Elyda Gonçalves por terem me assistido profissionalmente e pessoalmente, se tornando para mim amigos leais.

Dentre ainda os amigos do laboratório não poderia esquecer de Marcelo, Filipe, Felipe, Nayara, Jacqueline, Ana Pavla, Luciana, Karen, Karin, Barbara e a nossa querida amiga Cybelle a quem presto especial homenagem.

Agradeço também, a Heidi Lacerda companheira que me auxiliou e me instruiu demais nessa passagem.

Gostaria de agradecer todos os professores que compõem e tornam factíveis a pós-graduação em genética da UFPE, destacando os professores Valdir Balbino e Tercílio Calsa por promover o despertar da curiosidade científico/filosófico de todos nós que tivemos oportunidade de desfrutar de suas aulas, verdadeiros mentores.

Ainda a todos os funcionários que de maneira direta ou indireta auxiliaram no aprendizado desta etapa, dentre eles cito Sr. Romildo, D. Zizi entre tantos outros.

Agradeço aos meus familiares que proporcionaram todo o alicerce moral necessário para o desafio da vida e da ciência. Aos meus Pais queridos que me assistem ainda hoje em todos os momentos.

A minha Noiva, Cinthya Santos do Nascimento que promove o despertar do bom animo diário necessário para seguir e que muito me ajuda proporcionando diferentes pontos de vista.

“Ser suficientemente artista é ter capacidade de desenhar a imaginação. A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado. A imaginação envolve ao mundo.” Albert Einstein

Resumo

O *Papilomavírus bovino* (BPV) é o agente etiológico da papilomatose bovina. Esta apresenta lesões que normalmente são benignas e tendem a regredir, porém podem progredir a uma neoplasia. Muitas metodologias utilizadas para detecção de BPV se mostram inespecíficas e apresentam reações cruzadas com outros organismos relacionados. No entanto, a reação quantitativa em tempo real em cadeia da polimerase (qPCR) é uma ferramenta de destaque na detecção, tipificação e quantificação de nucleotídeos e vem sendo utilizada na clínica para avaliar carga viral. O objetivo do trabalho foi desenvolver um novo protocolo de detecção, tipificação e quantificação de BPV através da qPCR. Foram desenhados cinco pares de *primers*, que possuem como alvo uma região conservada do genoma viral (gene L1) de diferentes BPVs. A seletividade dos primers foi testada *in vitro* e DNA extraído de células MDBK não infectadas foram utilizados como controle negativo. A técnica de qPCR permitiu detectar, tipificar e quantificar material viral dos BPVs 1, 2, 4, 5 e 6. O limiar relativo da detecção foi de 4fg de DNA, em torno de 30-40 cópias de DNA/ μ L. Dos cinco pares de primers produzidos, quatro apresentaram mesmo perfil térmico durante a qPCR (qPCRBPV2, 4, 5 e 6), permitindo em um único procedimento detectar e tipificar os quatro tipos virais. A distinção das amostras foi realizada através da análise de *melting* que permitiu tipificá-las. Através da metodologia desenvolvida foi observado que em lesões cutâneas de bovinos infectados com BPV a carga viral não se mostrou inferior a 1000 cópias/ μ L, enquanto que a técnica permite quantificar até um limiar de 40 cópias de DNA/ μ L. Este trabalho possui relevância para validação de qPCR como diagnóstico da papilomatose bovina e particular importância quando aplicado em estudos da infecção pelo BPV e no monitoramento por veterinários da eficácia das futuras vacinas.

Palavras-chave: BPV; carga viral; genotipagem viral; qPCR.

Abstract

Bovine papillomavirus (BPVs) is the etiologic agent of bovine papillomatose which is characterized by hyper proliferative lesions. Papillomas in cattle are typically benign and often regress, but occasionally lesions can persist and progress to malignant neoplasia. The majority of current techniques for identification of BPV is unspecific and possesses cross-reactivity with closely related organisms. The Real-time quantitative polymerase chain reaction assay (qPCR) has become an exceptional tool for detection and quantification of oligonucleotides and has been utilized increasingly on viral load evaluation. Aiming to develop a new protocol for fast detection, typification and quantification of BPV in qPCR, we designed five pairs of Oligonucleotides for BPV1, 2, 4, 5 and 6 focusing on L1 gene. The qPCR *primers* sets were tested *in vitro* and *Madin-Darby Bovine Kidney Cells* (MDBK) DNA was also used as negative control. The Real-time qPCR assay provided an accurate detection and quantification for the BPVs 1, 2, 4, 5 and 6. The relative detection limit for the assays was 4fg or 30 to 40 genome equivalents. Four *primers* pairs (qPCRBPV2, 4, 5 and 6) had the same annealing temperature and their products showed differences on *melting* points analyses. Through the *melting* point analysis, samples can be identified and discriminated as a screening and then samples can be run for viral load. In our study we tested the viral load in bovine cutaneous skin warts and observed infections with 1000 copies/ μ L at least. However, this assay could reach levels of 40copies/ μ L. In conclusion, this methodology has an important impact on the validation of qPCR as a BPV diagnosis. Its relevance is proved when applied to BPV infection studies and the monitoring of the efficacy of future BPV vaccines by veterinarians.

Key words: BPV; viral load; viral genotyping; qPCR.

Lista de Figuras

Figura 1: Diagrama da organização do genoma de BPV1.....	5
Figura 2: Ciclo de Infecção do PV.....	6
Figura 3: Árvore Filogenética dos Papilomavírus Bovinos.....	9
Figura 4: Esquema de lesões papilomatosas.....	11
Figura 5: Papiloma Cutâneo de Búfalo.....	14
Figura 6: Eletroforese de Teste Múltiplo PCR Para Iniciador FR L1BPV1qPCR.....	31
Figura 7: Eletroforese de Teste Múltiplo Para Iniciador FRL1BPV5qPCR.....	32
Figura 8: Análise de Cq do Fragmento de L1BPV5qPCR e L1BPV6qPCR.....	33
Figura 9: Análise de Melting do Fragmento de L1BPV5qPCR e L1BPV6qPCR.....	34
Figura 10: Análise das Propriedades Físico-Químicas L1BPV5qPCR.....	35
Figura 11: Análise das Propriedades Físico-Químicas L1BPV6qPCR.....	35
Figura 12: Análise de Melting dos Oligonucleotídeos Gerados Pelo Multiplex dos Iniciadores L1BPVqPCR.....	37
Figura 13: Eletroforese do teste Multiplex qPCR BPVs 2, 4, 5 e 6.....	37
Figura 14: Eletroforese do Teste Multiplex qPCR BPV 2 e 5.....	38
Figura 15: Análise de melting dos oligonucleotídeos gerados pela reação multiplex dos iniciadores L1BPVqPCR.....	39
Figura 16: Eletroforese PCR Clássica Com Iniciador FRL1BPV1qPCR – Limite de Detecção	42
Figura 17: Limite de Detecção qPCR Iniciador FRL1BPV1qPCR.....	43

Lista de Tabelas

Tabela 01: Sequências dos primers para tipificação e detecção dos papilomas vírus bovino tipo 1, 2, 3, 4, 5 e 6.....	26
Tabela 02: Parâmetros dos primers para Detecção/Tipificação BPVs.....	33
Tabela 03: Sintomas, expressão e quantificação viral de amostras de sangue de bovinos.....	40

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

BPV	<i>Papilomavírus Bovino</i>
DNA	Acido desoxinucleotideo
dNTP	Desoxirribonucleotideos Fosfatados
E	Gene que codifica a proteína Early
E2F	Fator de transcrição
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
HPV	Papilomavirus Humano
KDa	Quilodaltos
L	Gene que codifica a proteína Late
LCR	Longa Regiao de Controle
MDBK	<i>Madin-Darby Bovine Kidney Cells</i>
μM	Micromolar
ORF	Quadro aberto de leitura (Open Reading Frame)
Pb	Pares de bases
PBS	Solução tampão fosfato-salino
qPCR	Reação quantitativa em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
PCR	Reacao em cadeia da polimerase
PV	Papilomavirus
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphisms)
URT	Regiao nao traduzida
X2	Qui-quadrado

Sumário

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	X
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	Xi
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 O Papilomavírus	3
2.1.1 Ciclo de infecção do Papilomavírus	5
2.2 Papilomatose Bovina	7
2.2.1 Infecção entre espécies, Diferentes Sítios de Infecção e Co-Infecção de BPV	12
2.3 Detecção e Diagnóstico	17
3. Objetivos	23
3.1 Geral	23
3.2 Específicos	23
4. Material e Métodos	24
4.1 Materiais e Reagentes	24
4.1.1 Linhagem Celular de Microorganismo e Plasmídios	24
4.1.2 Meio de Cultura e Crescimento	24
4.1.3 Kits, Marcadores, Reagentes e Demais Materiais	24
4.1.4 Equipamentos	25

4.2 Métodos	25
4.2.1 Desenho de Iniciadores (<i>Primers</i>)	25
4.2.2 Padronização das concentrações dos <i>Primers</i> e da PCR e qPCR	26
4.2.3. Multiplex qPCR	27
4.2.4 Análise das Sequências Nucleotídicas	28
4.2.5 Preparação das Amostras Biológicas e Extração de DNA	28
4.2.6 Detecção Viral (PCR e qPCR)	29
4.2.7 Limite de Detecção qPCR	30
5. Resultados	31
5.1 Padronização dos Iniciadores em PCR	31
5.2 Padronização dos Iniciadores em qPCR	32
5.2.1. Multiplex qPCR	36
5.3 Genotipagem dos BPVs em Amostras Clínicas Por PCR e qPCR	40
5.4 Limite de Detecção e Determinação de Carga Viral por PCR e qPCR	41
6. Discussão	45
7. Conclusão	52
8. Referências Bibliográficas	53
9. Currículo Lattes	63

1. Introdução

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. Dois segmentos lucrativos estão inseridos na criação de bovinos, as cadeias produtivas de leite e de carne. Possuindo o segundo maior rebanho de bovinos do mundo, estimado em 200 milhões de cabeças, e assumindo liderança em exportação desde 2004, o Brasil tem criado e assumido diversas restrições e cuidados com esse comércio. Entretanto, a papilomatose bovina, doença que causa desvalorização dos animais afetados, piorando a aparência e causando depreciação do couro, é ignorada pelos órgãos de fiscalização por não estar incluída nas doenças de notificação compulsória. A papilomatose bovina é uma doença viral, causada pelo papilomavírus bovino (BPV), que acomete o epitélio e a mucosa, induzindo lesões em bovinos e equinos. Os tumores ou papilomas causados pelo BPV são doenças emergentes de importância econômica para os criadores, por estar associada à perda de produtividade.

Os papilomavírus têm sido explorados pela comunidade científica por sua grande importância na bovinocultura. Promover medidas profiláticas para lidar com as doenças causadas pelos BPVs constitui estratégia de grande interesse para saúde animal. Para tanto, torna-se primordial o estabelecimento de um sistema de detecção e tipificação desses BPVs que forneça resultados robustos e seguros a um custo/benefício compatível.

Apesar da disponibilidade de metodologias que permitem detecção e identificação do vírus causador da infecção, os diagnósticos da papilomatose bovina ainda são pouco acessíveis, e muitas vezes restritos a áreas acadêmicas. Muitos dos estudos disponíveis acerca dos animais infectados em uma propriedade não permitem avaliações epidemiológicas e relatam a presença da infecção pelo BPV através do diagnóstico histopatológico. Perfis de infecção por regiões do corpo do animal, em diferentes

municípios e estados de um país ainda não foram realizados devido à dificuldade de obtenção dos dados e estabelecimento de diagnóstico por tipo viral. Desta maneira se faz imprescindível o desenvolvimento de uma técnica que permita não só a detecção, mas também a quantificação viral tipo específica presente nas amostras clínicas.

2. Revisão da Literatura

2.1 O Papilomavírus

Os papilomavírus (PV) pertencem a um grupo heterogêneo de vírus DNA classificados na família *Papillomaviridae*, que, comumente, infectam células basais nos epitélios cutâneo e mucoso induzindo-as à formação de lesões tumorais, conhecidas como papilomas ou verrugas (Bernard, 2006). As lesões são geralmente benignas e com tendência à regressão, mas sob a ação da integração viral e/ou co-fatores ambientais, podem progredir para tumores malignos. A papilomatose cutânea encontra-se amplamente disseminada em todo o mundo, sendo uma doença cosmopolita, e ocorre em diversas espécies de mamíferos e aves (Lancaster & Olson 1982, Campo & Jarrett 1986, Literak *et al.*, 2006; Bernard *et al.*, 2010).

Até a década de 1970, os PV eram pouco reconhecidos e considerados como agentes causadores de verrugas e lesões cutâneas benignas em alguns mamíferos e humanos. Tendo em vista que, em geral, verrugas eram associadas unicamente a problemas estéticos e não a uma ameaça à saúde, os papilomavírus representavam interesse apenas acadêmico como vírus humano causador de displasia. O desenvolvimento de novas técnicas na biologia molecular proporcionou a detecção de vários tipos de papilomavírus em lesões da mucosa, tanto benignas quanto malignas, como é o caso das verrugas genitais e câncer cervical, e dos papilomas na laringe, demonstrando a grande necessidade de expansão no conhecimento desses microrganismos (Gissman *et al.*, 1977; Zur Hausen, 2002).

Os papilomavírus são identificados pela abreviação PV e uma ou duas letras indicativas da espécie hospedeira, que podem ser derivadas de uma palavra em inglês como, por exemplo, HPV (*Human Papillomavirus*) para papilomavírus humano, ou do

nome científico do hospedeiro como, por exemplo, MnPV para papilomavírus *Mastomys natalensis*, que afeta uma espécie de rato africano (De Villiers *et al.*, 2004).

O PV é um pequeno vírus que pode ser oncogênico (dependendo do tipo), não envelopado, com morfologia icosaédrica e diâmetro de 55–60nm. O seu capsídeo é composto por 72 capsômeros, formados por pentâmeros de 360 cópias da proteína L1, além de 12 cópias de outra proteína, denominada L2, a qual atravessa o capsídeo e liga-se ao genoma viral (Baker *et al.*, 1991; Modis *et al.*, 2002).

O genoma do PV é constituído por uma fita dupla de DNA circular com massa molecular de $5,0 \times 10^6$ Dalton e tamanho de cerca de 8kb (Stringfellow *et al.*, 1988), constituída de oito sequências abertas de leitura (*open reading frames* – ORF), distribuídas em duas regiões principais *E* e *L*, conforme o padrão temporal de expressão. O segmento inicial de expressão precoce (*early* - *E*) apresenta seis ORFs e representa 45% do genoma viral. Está intimamente ligado a manutenção e proliferação do vírus no hospedeiro (Campo, 2006). O segmento tardio (*late* – *L*) contém duas ORFs, representa 40% do genoma viral e promove a codificação de proteínas que irão compor a estrutura do capsídeo viral, quando da liberação dos vírions. Entre os segmentos *E* e *L* existe a LCR (*long control region* – *Região longa de controle*) que é uma área não-codificante do genoma viral, de aproximadamente 500-1000 nucleotídeos, situada entre o terminal 3' da ORF *L* e o terminal 5' da ORF *E*. Essa região contribui com 15% do genoma viral e possui inúmeros locais de ligações para os repressores e ativadores da transcrição, além da origem de replicação (Borzacchiello & Roperto, 2008). Embora esta seja a organização convencional para o genoma dos PVs, há alguma variação quanto à presença e ausência de ORFs, a depender do tipo viral considerado (Buck *et al.*, 2005). A Figura 1 demonstra o panorama geral do genoma do papilomavírus (Freitas *et al.*, 2011).

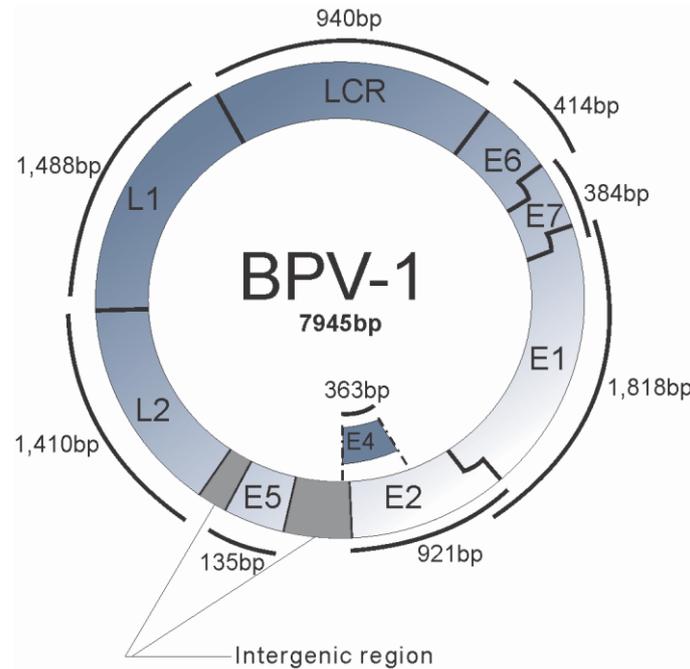


Figura 1: Diagrama da organização do genoma de BPV1. O genoma viral está representado em círculo, demonstrando as posições dos genes virais E6, E7, E1, E2, E4, E5, L2, L1, e o LCR entre os genes L1 e E6. Fonte: Freitas *et al.* (2011)

2.1.1 Ciclo de infecção do *Papilomavírus*

A transmissão dos PV é facilitada pela presença de abrasões na superfície do epitélio. Grande parte das infecções são assintomáticas ou subclínicas e mantêm-se indetectáveis através do tempo. Os PV parecem coexistir com seus hospedeiros por longos períodos de tempo, alguns ocorrem preferencialmente em um ciclo latente, pois uma grande variedade de tipos de PV já foi isolada de pessoas e animais aparentemente saudáveis (Antonsson & Hansson, 2002; Antonsson *et al.*, 2003a; Antonsson *et al.*, 2003b; Ogawa *et al.*, 2004).

O ciclo de vida dos PV está intimamente ligado à diferenciação epitelial, já que se replicam no epitélio escamoso estratificado da pele e mucosas. As células infectadas se dividem e espalham lateralmente. Algumas células migram para as camadas suprabasais e se diferenciam onde genes virais são ativados formando o capisídio viral (Figura 2) (zur Hausen, 2002).

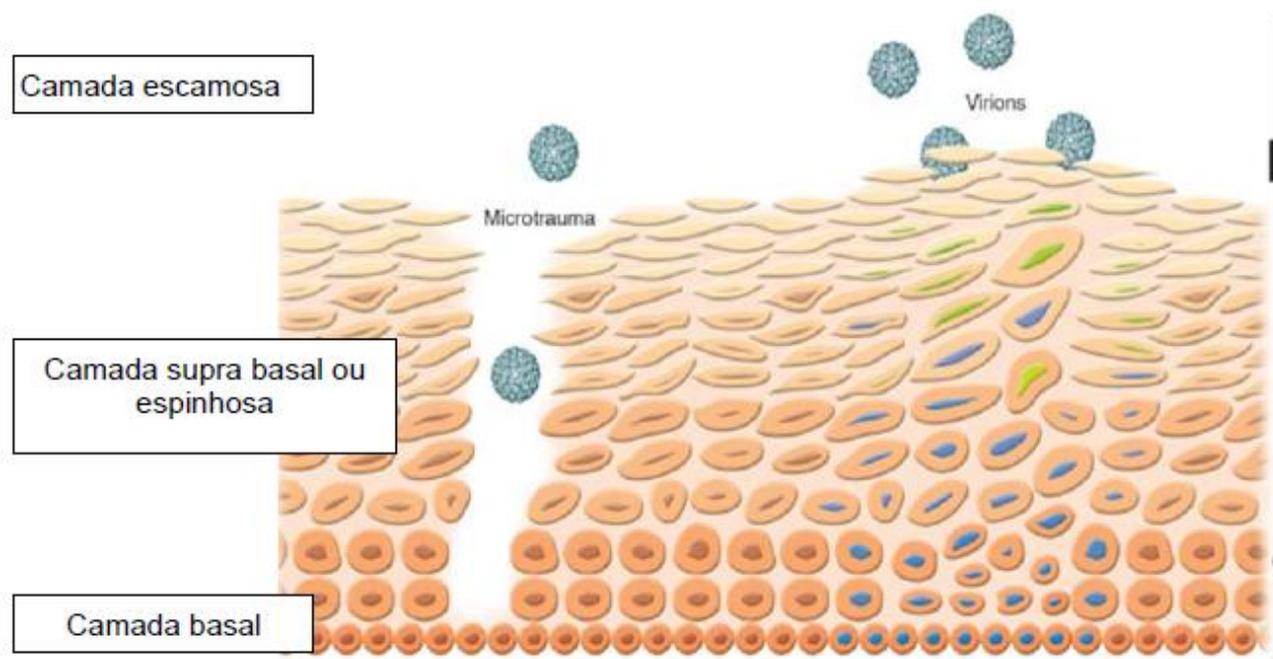


Figura 2: **Ciclo de infecção do PV.** Entrada do vírus no tecido epitelial através de trauma e infecção na camada basal (células com núcleo azul). As células de núcleo verde indicam a expressão das proteínas L1 e L2 para montagem dos vírions que serão liberados posteriormente. Fonte: Lowy and Schiller (2006).

Os PV infectam a camada basal do epitélio cutâneo ou mucoso expressando seus genes de acordo com o programa de diferenciação celular do tecido. Os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 estão envolvidos em diferentes momentos do ciclo. O gene E1 codifica uma proteína com atividade helicase e interage com a DNA polimerase, sendo responsável pela replicação do DNA viral (Seo *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1991). O gene E2 codifica uma proteína que atua como fator de transcrição (Mcbride, Romanczuk & Howley, 1991). A perda da expressão de E2 está correlacionada com o aumento da proliferação celular induzido por E6 e E7, uma vez que E2 inibe a transcrição destas últimas (Hedge, 2002).

Os genes E5, E6 e E7 codificam oncoproteínas que estimulam o crescimento e transformação das células (Zur Hausen, 1996; Zur Hausen, 2002). A proteína E4, por sua vez, parece ter um papel importante na liberação das partículas virais, pois é encontrada, principalmente, nas células das camadas mais diferenciadas do epitélio infectado (Zur Hausen, 1996; Zur Hausen, 1999). Nas células da camada superior do epitélio, existe uma maior concentração das proteínas estruturais que formam o capsídeo viral, L1 e L2 (Longworth & Laimins, 2004). Ambas possuem epítomos que induzem a produção de anticorpos reativos, com resposta tipo-específica para cada de tipo de PV, direcionada predominantemente à L1, que forma 90% do capsídeo (Campo, 2006; Borzacchiello & Roperto, 2008; Rose *et al.*, 1994).

As características biológicas e moleculares do papilomavírus já estão bem estabelecidas, onde o conhecimento do ciclo celular, inter-relação gênica e proteica já se encontram bastante discutidas na literatura, entretanto quanto à papilomatose bovina como doença, esta vem sendo aos poucos mais explorada, porém ainda possui poucos dados que auxiliem a tomada de decisões por parte dos órgãos de vigilância sanitária no controle da infecção e levantamento epidemiológico da doença.

2.2 Papilomatose Bovina

O agente etiológico da papilomatose bovina é o *Papilomavírus bovino* (BPV). Até o momento doze diferentes tipos de BPVs estão bem elucidados: BPV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12. Originalmente a classificação dos BPV, de 1 a 6, era realizada em dois subgrupos, A e B, tomando-se como base a estrutura do genoma viral e a patologia associada à infecção. O subgrupo A era compreendido pelos tipos 1, 2 e 5, os quais eram definidos como fibropapilomavírus por infectarem tanto o epitélio como a área

subdérmica, formando fibropapilomas. O subgrupo B, dito epiteliotrópicos, compreendia os tipos 3, 4 e 6, por infectarem apenas células epiteliais (queratinócitos), induzindo a formação de papilomas verdadeiros (Campo, 2002; Zhu *et al.*, 2011).

A classificação atual dos BPV se dá através das propriedades biológicas e das características de organização do genoma. Os BPVs epiteliotrópicos (BPV 3, 4, 6, 9, 10, 11 e 12) são definidos como *Xi-papilomavírus*; os BPV 1 e 2 como *Delta-papilomavírus*; e os BPV 5 e 8 como *Epsilon-papilomavírus*, Figura 3 (de Villiers *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2007; Hatama *et al.*, 2008).

A identificação de novos tipos de PV é realizada através do gene L1 presente no segmento tardio e tem sido utilizada por ser o mais conservado do genoma. O guia de nomenclatura dos papilomavírus em 1995 na 14^a Conferencia Internacional em Quebec, Canadá, definiu um novo isolado como **novo tipo viral**, caso a sequência de L1 apresente menos que 90% de similaridade entre todos os tipos já conhecidos. Diferenças entre 2% e 10% na sequência de L1 definem um novo **subtipo** e menores que 2% definem um novo **variante** (De Villiers *et al.*, 2004). Análises filogenéticas baseadas na ORF L1 classificaram um isolado de BPV do Japão como BPV-7, originando um novo gênero na família Papillomaviridae (Figura 3) (Ogawa *et al.*, 2007).

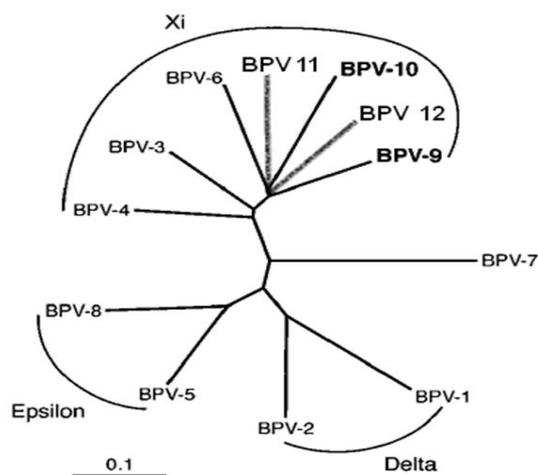


Figura 3. **Árvore filogenética dos Papilomavírus bovinos.** Adaptado de Hatama *et al.* (2008).

Os *Papilomavírus bovinos* produzem lesões em diferentes regiões do corpo do animal ocasionando diversas complicações (Figura 4). O BPV 1 e o BPV 2 são os principais agentes de fibropapilomas cutâneos. O BPV 1 também pode causar fibropapilomas nas tetas e no pênis e o BPV 2 no trato digestório. O BPV 5 causa fibropapilomas em forma de grão de arroz no úbere e os BPV 3, 4 e 6 foram isolados de papilomas epiteliais cutâneos, papilomas do epitélio do trato digestório e papiloma epitelial de tetas, respectivamente. O BPV 8 foi associado a papilomas epiteliais da pele, já os BPVs 9 e 10 foram descritos como causadores de papilomas escamosos do úbere. Assim, são carcinogênicos os BPVs 1, 2 e 4, sendo os tipos 1 e 2 relacionados com o câncer de bexiga urinária e o BPV-4 com o câncer do trato digestório superior (Bloch, 1997; Schuch, 1998; van Regenmortel *et al.*, 2000; Borzacchiello and Roperto, 2008).

A papilomatose bovina, também conhecida como verruga, figueira, verrucose, fibropapilomatose ou epitelioma contagioso, é caracterizada pela presença de lesões tumorais que ocorrem na pele, mucosas e em alguns órgãos. As lesões papilomatosas classificam-se em papilomas escamosos, mucosos, planos e pedunculares, de acordo

com a superfície, zona ou local onde são produzidos e a forma que apresentam o seu desenvolvimento. Os escamosos acometem a pele ou qualquer parte do corpo que apresente epitélio estratificado e produzem proliferação desse epitélio. São comuns em bovinos jovens e ocorrem principalmente na cabeça, especialmente ao redor dos olhos, pescoço e ombros, e podem se espalhar por outras partes do corpo (Figura 4). O tamanho varia e a aparência seca é semelhante à couve-flor. Papilomas mucosos se apresentam como nódulos encapsulados e circunscritos. Os papilomas planos promovem engrossamento da epiderme com queratinização forte nas camadas superficiais e nos animais aparecem como nodulações arredondadas com pouca saliência da superfície da pele e desprovidas de pelo. Já os papilomas pedunculares são neo-formações que se sobressaem da pele como prolongamentos de diferentes longitudes e que podem se apresentar em forma de dígitos. São muito comuns nas tetas e úbere, mas são de difícil tratamento (Melo e Leite, 2003; Freitas *et al.*, 2011).

Embora não necessariamente caracterize um processo carcinogênico, a papilomatose bovina é uma doença importante por causar depreciação no valor dos animais (Mello e Leite, 2003). A extensão e duração do crescimento dos papilomas estão relacionadas à idade, à receptividade genética, ao manejo inadequado e à imunodeficiência. O problema pode atingir até 75% de um rebanho e, pela existência de novos animais susceptíveis a papilomatose, pode durar anos (Freitas *et al.*, 2011).

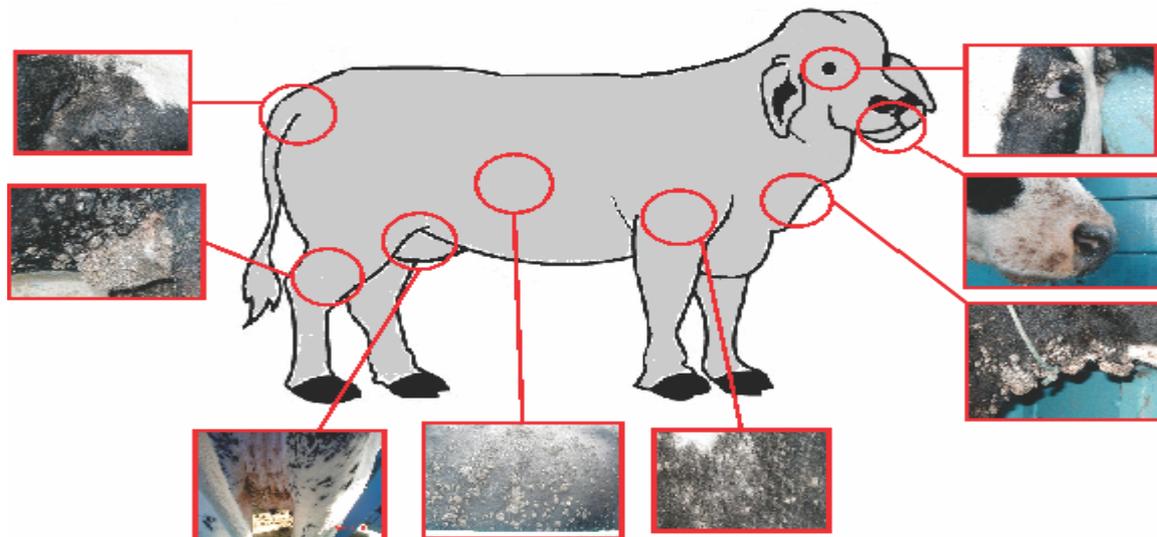


Figura 4: **Esquema de lesões papilomatosas.** Detalhes em diferentes regiões do corpo de um bovino. Fonte Freitas *et al.* (2011).

Dependendo da intensidade das lesões e debilitação do animal, alterações funcionais/orgânicas podem ser ocasionadas pelos tumores. Infecções bacterianas secundárias podem resultar em perda de condição corporal. A supuração das verrugas traumatizadas pode resultar em dermatite necrótica. A hemorragia e miíase de verrugas traumatizadas também não são incomuns e podem resultar na morte do animal. Interferências na lactação e no coito também são relatadas, devido à obstrução física. A mastite devido à infecção ascendente e o trauma de papilomas múltiplos na base das tetas foram relatados como possíveis causas de perda produtiva nos animais (William *et al.*, 1992). A doença é cosmopolita e, em determinadas formas, acomete principalmente animais de até dois anos de idade, embora todas as faixas sejam atingidas (Mello & Leite, 2003). Para a transmissão da forma cutânea, exige-se solução de continuidade na pele e a infecção pode ocorrer por contato direto (animal-animal) ou indireto (fomites).

Uma manifestação conhecida e bastante preocupante da papilomatose bovina em rebanhos é a **hematúria bovina enzoótica (EBH)**, doença neoplásica inflamatória crônica da bexiga urinária de bovinos. Clinicamente é caracterizada pela hematúria, anemia e debilidade progressiva seguida de morte. Em um estudo realizado em bovinos na Itália,

envolvendo amostras de tumores de bexiga coletadas em abatedouro, verificou-se que 77% delas eram positivas para BPV-2. Este quadro clínico está associado ao consumo de samambaia, assim como infecção pregressa pelo BPV (Borzacchiello *et al.*, 2003; Dawra & Sharma, 2001).

A malignização de papilomas pré-existentes está associado à ação sinérgica de cofatores ambientais (Stocco dos Santos *et al.*, 1998; Campo, 2002). Leal *et al.*, (2003) mostraram que células Palf (fibroblasto de palato de bezerro) expressando a oncoproteína E7 de BPV-4, Ha-ras (ativo) e tratadas com quercetina apresentaram uma taxa mais elevada de aberrações cromossômicas estruturais contendo rearranjos peculiares oriundos de possíveis fusões cêntricas.

Assim como muitos vírus, BPVs podem estabelecer uma infecção latente. O genoma viral é frequentemente encontrado em epitélios normais, sem sinais clínicos da doença (Ogawa *et al.*, 2004). Epitélios normais são sítios receptores de infecção latente e a reativação do BPV em locais de trauma sugere que o DNA viral está presente neste sítio e que os danos do epitélio, possivelmente através da produção de citocinas inflamatórias e do estímulo da proliferação celular, induz à expressão de genes virais levando à formação de papiloma (Campo, 2006).

2.2.1 Infecção entre espécies, diferentes sítios de infecção e Co-infecção de BPV

Os BPV são descritos como epitélio-específicos, porém a sua presença já foi encontrada em diferentes tecidos e fluidos, tais como sangue periférico, plasma sanguíneo, leite, células da imunidade como linfócitos (Stocco dos Santos *et al.*, 1998; Freitas *et al.*, 2003; Wosiacki *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009) e tecidos reprodutivos, incluindo oócitos, ovário, útero, placenta, células do cúmulus, fluidos uterino

como líquido amniótico, sêmen e espermatozóide (Carvalho *et al.*, 2003; Yagui *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011).

Existe uma variedade de implicações relativas às infecções virais no trato reprodutor e no sêmen, que incluem a disseminação de doenças, devido à possibilidade de risco de transmissão para as gerações subsequentes e infertilidade/esterilidade. Infecções do ovo e embrião, aborto e anormalidades embrionárias e fetais são resultados comuns de infecções nesses tecidos (Dejucq & Jégou, 2001). Uma série de doenças pode ser transmitida, em bovinos, tanto pelo acasalamento, quanto pela inseminação artificial (Wentink *et al.*, 2000). O primeiro estudo buscando avaliar a relação do BPV e o trato reprodutivo em bovinos foi realizado pelo nosso grupo (Grupo de Estudos Moleculares Aplicados a Papilomavíruses – GEMAP) e verificou a presença de material genético de BPV 1 e 2 no trato reprodutivo e gametas de vacas (Carvalho *et al.*, 2003). Posteriormente, Yagui *et al.* (2006) verificaram a presença de BPV 1 e 4 no trato reprodutivo de fêmeas e de BPV 2 em sêmen bovino. Freitas *et al.* (2007) detectaram a presença de BPV em placenta, líquido amniótico e sangue de bezerro recém-nascido sugerindo assim a transmissão vertical de BPV. Silva *et al.* (2011) verificaram a alta prevalência de BPV2 em doses de sêmen comercial de bovinos, porém sem causar nenhuma alteração nos parâmetro de fertilidade dessas amostras

Os papilomavírus são tidos como espécie-específicos, porém o BPV é presente em alguns tipos de lesões específicas em outras espécies de animais que não bovinos. Uma doença similar a papilomatose bovina acomete búfalos, mas tem recebido menos atenção que em bovinos (Silvestre *et al.*, 2009). Devido à boa adaptação desses animais em ambientes diversos e aumento no consumo de derivados do leite de búfalos, esses animais estão sendo criados em áreas tradicionais de criação de bovinos e frequentemente dividem os mesmos espaços nas fazendas. O búfalo é uma espécie pertencente à família *Bovidae* e a infecção cruzada pelo BPV tem aumentado

vertiginosamente nesses rebanhos, preocupando os criadores. Os BPV 1 e 2 estão associados ao desenvolvimento das lesões papilomatosas em bubalinos (Figura 5) e a ocorrência de hematúria enzoótica já foi relatada nesses animais. Após estabelecimento da infecção em bubalinos, essa pode disseminar entre os búfalos sem o intermédio de bovinos, e levando às mesmas complicações e perdas econômicas nos plantéis desses animais (Somvanshi, 2011).

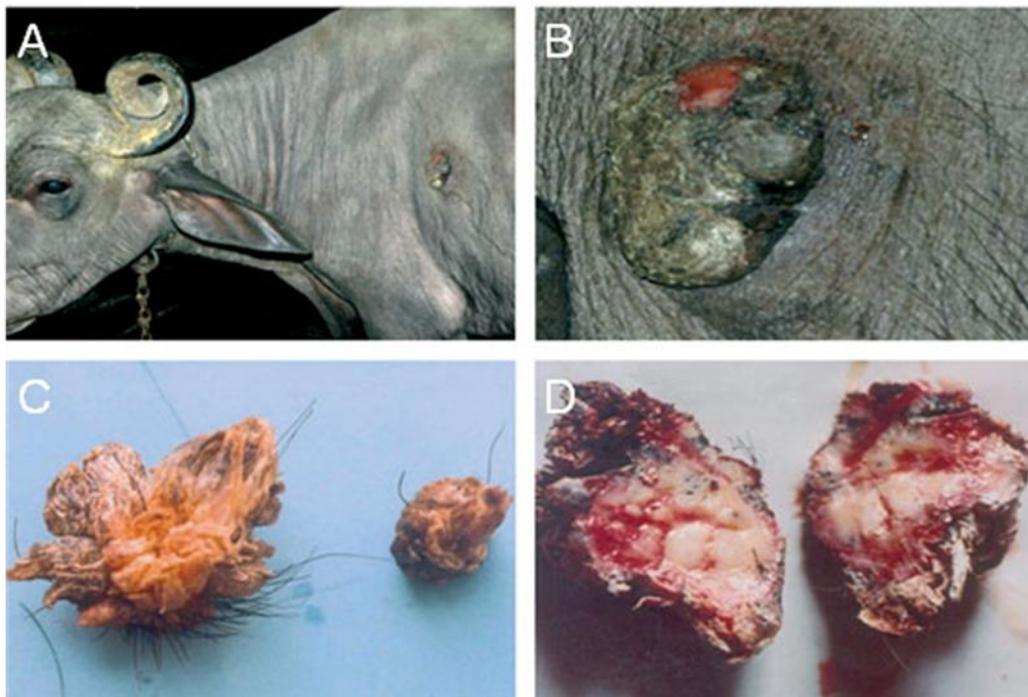


Figura 5: **Papiloma cutâneo de búfalo**. A) Crescimento de uma massa celular anormal. B) verruga cutânea em detalhe; C) Papiloma cutâneo de búfalo dissecado; D) Lesão papilomatosa de crescimento em epiderme de búfalo. Áreas queratinizadas estão limitadas à periferia. Fonte: Somvanshi R (2011).

A associação da infecção pelo *Papillomavirus bovino* a lesões em equinos já está bastante discutida na literatura. Lesões ditas sarcóides que acometem equídeos como mulas, zebras, cavalos e burros foram associadas à infecção pelos BPV 1 e 2. Através de técnicas de PCR, foi possível detectar o DNA de BPV em 100% das amostras de sarcóide investigadas e em tecidos aparentemente intactos que circundam a área lesionada,

sugerindo que a infecção reside nos fibroblastos de maneira latente e o desenvolvimento da lesão é condicionado a fatores de ativação (Stanek *et al.*, 2008).

As lesões de sarcóides afetam todas as espécies da família Equidae. São lesões tumorais invasivas dos fibroblastos e representam a neoplasia mais frequente e prevalente entre essa família, chegando a valores entre 12,9 e 67% de todos os tumores de equinos. Até 2008 não havia relatos da presença da estrutura do capsídeo viral nas lesões desses animais, apenas detecção de genes e proteínas nos fibroblastos, levando a suposições de que a infecção era abortiva. Entretanto, partículas virais (VLPs) de BPV 1 foram recentemente identificadas em sarcóides utilizando técnica de PCR de imunocaptura, sendo a primeira evidência da presença intralesional dos vírions de BPV na doença (Brandt *et al.*, 2008, Finlay *et al.*, 2009).

Alguns estudos mostraram que lesões transientes tipo sarcóide podem ser induzidas via inoculação através do extrato de uma lesão tipo sarcóide e de vírus purificados. Alguns relatos também demonstram que as infecções em equinos estão associadas a um diferente tipo variante do BPV1 que não é encontrado nas lesões que acometem bovinos, sugerindo assim, que há transmissão direta entre equinos (Nasir *et al.*, 2007; Finlay *et al.*, 2009; Nasir & Campo 2008)

Além da transmissão direta da papilomatose bovina entre diferentes espécies de animais, havia questionamentos quanto à proliferação e disseminação da infecção em um mesmo rebanho, onde não havia contato direto entre animais nas diferentes fazendas. Neste sentido, em 2009, um estudo detectou a presença de material genômico de BPV em diferentes tipos de moscas que estavam presentes nestas fazendas, sugerindo que esse artrópode funcionaria como vetor da infecção entre diferentes animais (Nasir *et al.*, 2009; Finlay *et al.*, 2009).

Foram avaliadas lesões papilomatosas em outras espécies de mamíferos, que estão distantes filogeneticamente dos bovinos, e evidenciou-se a presença de BPV 1 e 2, atuando como agente causador das lesões. Espécies como girafa e zibelino, um mamífero carnívoro natural do Norte da Ásia e da África foram recentemente identificados como portadores da infecção pelos BPVs 1 e 2 (van Dyk *et al.*, 2011).

Também foi recentemente descrita a presença do *Papilomavírus de sarcóide Felino* (FeSarPV), infectando lesões em bovinos (Silva *et al.*, 2012). O FeSarPV está associado a lesões tipo sarcóide que infectam felinos silvestres que residem em áreas próximas a criações de bovinos. O sarcóide felino é um tumor bastante raro, possuindo poucos relatos na literatura (Munday & Knight, 2010; Schulman *et al.*, 2001; Munday *et al.*, 2010). Um outro ponto quanto ao FeSarPV é a proximidade filogenética desse ao gênero dos *Deltapapillomavírus* (BPV 1 e 2). Alguns autores sugerem que o FeSarPV utiliza os felinos apenas como hospedeiros não permissivos (Teifke *et al.*, 2003; Munday *et al.*, 2010) e ainda inferem que os hospedeiros naturais desse tipo viral são ruminantes (Silva *et al.*, 2012).

Vem sendo descrito na literatura a ocorrência de lesões causadas por diferentes tipos de BPV em sítios de infecção diferentes no corpo do animal, promovendo aspectos diversos da lesão (Carvalho *et al.*, 2012), assim como lesões com morfologias características de infecção por determinado tipo viral sendo causada por outro tipo de BPV (Claus *et al.*, 2009). O BPV 4 no estudo de Carvalho *et al.* (2012) foi encontrado em lesões cutâneas, entretanto este tipo viral é relacionado à infecção em mucosas e é responsável por câncer do trato digestivo superior. Já BPV 5 e 6, que estão relacionados a lesões nas tetas e úbere, foram relatados promovendo papilomas ao redor do olho e ombro de bovinos (Carvalho *et al.*, 2012). A presença de BPV 1 e 2 já foi relatada em outros tecidos como sangue e células reprodutivas (Yagui *et al.*, 2006, 2008; Diniz *et al.*, 2009; Lindsey *et al.*, 2009). Os BPV 1 e 2 foram relatados co-infectando lesões em

bovinos na Índia (Leishangthem *et al.*, 2008; Pangty *et al.*, 2010). Assim como já foram encontrados cinco diferentes combinações de infecção múltiplas em bovinos (Claus *et al.*, 2009). No Brasil altas incidências de BPV 3 foram relatadas, assim como presença de BPV tipo 2, 3, 4 e 10 na mesma lesão foi demonstrada (Carvalho *et al.*, 2012).

A ocorrência da co-infecção por BPV em uma única amostra sugere que não há uma competição natural entre os diferentes tipos virais (Schmitt *et al.*, 2010). Entretanto, ainda não está claro se os diferentes tipos de BPV co-infectando as mesmas lesões são capazes de promover uma nova infecção. Alguns relatos descrevem que a infecção pelo BPV em sítios não característicos é abortiva por não produzir novos vírions (Amtmann *et al.*, 1980; Lancaster, 1981; Bogaert *et al.*, 2008). Porém, muitos animais são constantemente afetados com papilomas em várias partes do corpo, o que pode ser consequência da co-infecção, que levaria a baixa da imunidade e dificuldade de regressão das lesões (Freitas *et al.*, 2011).

A classificação viral aceita antigamente sofreu alterações, visto que um dos parâmetros utilizados para distinção dos BPVs era o tipo de lesão associada ao tipo de papilomavírus. Devido o desenvolvimento de novas metodologias que promoveram a genotipagem dos BPV, foi possível detectar e tipificar os papilomavírus bovinos presentes nas diferentes lesões, elucidando a capacidade de infecção em diferentes sítios (Freitas *et al.*, 2011).

2.3 Detecção e Diagnóstico

Em geral, técnicas de detecção viral envolvem o isolamento do vírus em cultura de células (Varella *et al.*, 2005). Entretanto, o papilomavírus se desenvolve de modo

dependente da diferenciação celular (Zur Hausen, 2002), o que torna inviável a reprodução *in vitro* da diferenciação celular ocorrida no epitélio *in vivo* (Souza, 2007).

A identificação histológica através dos métodos de coloração usuais ainda hoje é utilizada como ferramenta auxiliar na determinação do diagnóstico de lesões papilomatosas. Entretanto, identificação direta do DNA de PV é atualmente o método de escolha para a sua detecção em esfregaços ou amostras de tecidos. A técnica de imunohistoquímica que detecta o revestimento proteico das partículas virais, detectando o vírus apenas durante a fase de liberação, foi sugerida como metodologia para detecção dos PVs. Entretanto, esse não é um método de escolha para o diagnóstico de infecções pelo PV em virtude de sua baixa sensibilidade e grande período de latência que algumas infecções apresentam (Lancellotti et al., 2000).

Existem vários métodos moleculares para a detecção de DNA viral, sendo os principais a hibridização fluorescente *in situ* (FISH), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*- Polimorfismo de Fragmento de restrição), reação em cadeia da polimerase (PCR), Sequenciamento, *Southern* e *Dot blot* (Moljn et al., 2005). Para a detecção geral de PV as técnicas utilizadas com frequência têm sido RFLP, PCR e sequenciamento (Stocco dos Santos et al., 1998; Silva et al., 2005). Estas técnicas são eficientes por não requererem o cultivo viral, sendo a PCR a mais sensível dentre elas.

A PCR é uma técnica que permite a amplificação enzimática do DNA ou RNA *in vitro*, promovendo, com rapidez, o aumento no número de segmentos de ácidos nucleicos, que podem ser visualizados através da eletroforese (Hirigoyen et al., 1992; Gross & Barrasso, 1999). Esta técnica permite detectar pequenas quantidades de DNA viral presente no material, amplificando-o em quantidades identificáveis.

A PCR tornou-se a mais adequada técnica para a detecção do PV, devido ao alto nível de sensibilidade e especificidade (Moljn et al., 2005). Existem diversos

oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a detecção de PV (Forslund *et al.*, 1999; Gravitt *et al.*, 2000; Antonsson & Hansson, 2002, Ogawa *et al.*, 2004, Maeda *et al.*, 2007) e diferentes sequências de *primers* específicos foram propostas por vários pesquisadores, com a finalidade de identificação dos BPVs 1, 2 (Otten *et al.*, 1993; Wosiacki *et al.*, 2005), 4 (Gaukroger *et al.*, 1991) e 5 (Bloch *et al.*, 1997).

Nas PCRs de detecção geral de HPV são frequentemente utilizados os pares de *primers* degenerados FAP59/64, mais específicos para detecção do vírus em epitélio, e MY11/09 que detectam mais especificamente o vírus em tecido mucoso (Manos *et al.*, 1989; Forslund *et al.*, 1999; Tornesello *et al.* 2006). Estes mesmos *primers* são utilizados em detecção de BPV, apesar da diminuição de especificidade (Ogawa *et al.*, 2004; Claus *et al.* 2007; Carvalho *et al.*, 2012).

A diferença de sensibilidade tecidual entre os *primers* de detecção geral é devido à região de anelamento utilizada para designar os mesmos, pois cada tipo possui uma identidade molecular. Os *primers* MY 09/11 foram desenhados com base na região L1 de tipos virais característicos de mucosas (Manos *et al.*, 1989). Já os *primers* FAP 59/64 foram desenhados a partir da região L1 de tipos virais epiteliais (Forslund *et al.*, 1999).

Apesar do uso de PCR na detecção de ácidos nucleicos sem quantificá-los, sendo assim conhecida como PCR qualitativa, essa metodologia é muito utilizada em diagnósticos de patologias. Um fator preocupante nas PCR qualitativas diz respeito à sensibilidade da reação e segurança do resultado obtido. Assim, mesmo uma metodologia qualitativa que forneça resultados positivos ou negativos para uma dada infecção, deve descrever a característica do procedimento e performance da reação (Wittwer *et al.*, 2009).

Assim a reação quantitativa em tempo real de cadeia da polimerase qPCR foi inserida no contexto da amplificação de ácidos nucleicos com a capacidade de

quantificação. Por ser uma técnica análoga à PCR clássica qualitativa, a qPCR apresenta todas as vantagens do procedimento que a clássica possui e outras, sendo: economia de tempo de reação, material utilizado, número de equipamentos necessários, descartáveis utilizados durante o procedimento, infraestrutura e descarte de material tóxico ao meio ambiente. Outro ponto importante na diferenciação das duas técnicas diz respeito à capacidade de análise do material testado (Ririe *et al.*, 1997).

A qPCR possui a capacidade de detectar e mensurar quantidades diminutas de ácido nucleico em diferentes tipos de amostras de diferentes origens, sendo uma tecnologia de excelência no diagnóstico molecular, agricultura e medicina (Bustin SA, 2000; Kubista *et al.*, 2006). A combinação da simplicidade com a rapidez, sensibilidade e especificidade em um procedimento homogêneo, tornou a qPCR a técnica de escolha para quantificação de ácidos nucleicos. Além do uso em pesquisa, muitas aplicações em diagnósticos têm sido desenvolvidas, incluindo quantificação microbiológica, identificação de transgenes em alimentos modificados e usos forenses (Bustin & Mueller, 2005; Bernard & Wittwer, 2002; van den Berg *et al.*, 2007). As reações de qPCR permitem ao técnico avaliar informações de identidade das sequências analisadas bem como o padrão de amplificação através das análises da curva de *melting*.

A temperatura de *melting* é definida como o equilíbrio alcançado, em dada temperatura, entre a formação e a dissociação dos oligonucleotídeos pelo estabelecimento e rompimento de pontes de hidrogênio entre os nucleotídeos complementares: 50% dos oligonucleotídeos estão anelados, e 50% encontram-se dissociados entre si. A qPCR lança mão da captação da emissão de fluorescência para construção da curva de *melting* de um oligonucleotídeo. Essa fluorescência é emitida a partir de algum fluoróforo como o *SybrGreen* após sua ligação com a dupla fita de DNA e estímulo por variação de comprimentos de onda. Assim, com a análise da curva de *melting* é possível visualizar e identificar oligonucleotídeos traçando o perfil de

dissociação referente à identidade molecular (Mackay *et al.*, 2002). Com essa ferramenta a qPCR retira completamente o fator subjetivo da análise, pois registra através de sensores a luminosidade emitida pelo sistema. O uso da ferramenta de *melting* permite genotipagem em um único tubo de amostras de material genético, através de análises utilizando sondas marcadas (Elenitoba-Johnson *et al.*, 2001).

Outra utilização da PCR quantitativa é a possibilidade de realizar reações multiplex, principalmente quando aplicada a detecção de mutações pontuais ou polimorfismo (Elnifro *et al.*, 2000; Wittwer *et al.*, 2001). O termo multiplex é comumente utilizado para descrever o uso de múltiplas sondas que são detectadas pela fluorescência para discriminação entre múltiplos amplicons (Elenitoba-Johnson *et al.*, 2001). Essa técnica requer a comprovação da não alteração da eficiência da reação quando aplicada a quantificação de múltiplos alvos em um único tubo. Isso se torna ainda mais importante quando oligonucleotídeos alvos de poucas cópias são co-amplificados com outros de maior número na mesma reação (Wittwer *et al.*, 2009).

Por ser padronizada e utilizada em todos os experimentos sob mesma calibração a qPCR define critérios de avaliação que não contam com a subjetividade da visualização humana, enquanto que a PCR clássica depende da visualização do experimentador para definir o limite de detecção da técnica. Através da análise de curva de *melting* protocolos de identificação por reações qPCR multiplex permitem diagnóstico para até quatro viroses, Herpes Simplex Virus (HSV) 1 e 2, Varicella Zoster Virus (VZV) e enteroviroses (Read *et al.*, 2001).

Até 2010 havia apenas um relato na literatura da utilização da qPCR em testes com o papilomavírus bovino (Van Dyk *et al.*, 2009). Assim, em 2010, foi desenvolvida uma metodologia que permitiu quantificar o BPV 1 em lesões cutâneas de papilomas de bovinos e búfalos coletadas em criações leiteiras na Índia. A identificação através de estudos histológicos em animais que não apresentavam sinais clínicos da infecção pelo

BPV não foi possível, porém esses animais pertenciam a rebanhos com histórico de ocorrências dessa infecção e através da metodologia desenvolvida foi observada a presença do vírus, apesar da carga viral se apresentar muito baixa (Pangty *et al.*, 2010).

Em 2011 foi desenvolvido um protocolo para identificação e quantificação de BPV2 através de qPCR em amostras biológicas de tecidos da bexiga urinária e de urina de animais apresentando *hematúria bovina enzoótica* (Somvanshi *et al.*, 2011). Entretanto, até o momento os protocolos desenvolvidos para tipificação e quantificação de BPV através de SybrGreen não possuem a capacidade do uso em multiplex, abordando apenas os papilomavírus bovinos tipo 1 e 2.

Como discutido por Van Dyk *et al.* (2009), o aumento no desenvolvimento de novos protocolos utilizando a qPCR pode ser atribuído a alta sensibilidade desta metodologia por permitir visualizar resultados em amostras que possuem menos de 1,5 cópias de DNA alvo. A qPCR também promove a detecção e quantificação de diferentes tipos virais em reações multiplex em um único tubo (Wittwer *et al.*, 2009).

3. Objetivos

3.1 Geral

- Desenvolver um protocolo de detecção, tipificação e quantificação do Papilomavírus bovino pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) para os tipos 1, 2, 4, 5 e 6.

3.2 Específicos

- Desenho dos *primers* de tipificação dos BPV;
- Padronizar a técnica de PCR clássica para detecção e tipificação com os *primers* desenhados;
- Padronizar a PCR em tempo real para detecção, tipificação e quantificação dos BPV;
- Comparar os limites de detecção entre técnica de PCR clássica e PCR em tempo real.

4. Material e Métodos

4.1 Materiais e Reagentes

4.1.1 Linhagem Celular de Microorganismo e Plasmídios

A linhagem DH5 α de *Escherichia coli* (Invitrogen – Carlsbad, CA, EUA), possibilitou a propagação e amplificação de DNAs plasmidiais. A linhagem MDBK- *Madin-Darby Bovine Kidney Cells*) não infectados pelo BPV foi utilizado como controle negativo. O plasmídio pAT153 clonado com os genomas virais dos tipos 1, 2, 4, 5 e 6 do BPV, em separado, foram cedidos por Campo & Coggins (1982). Estas construções foram utilizadas para os ensaios de padronização das PCR e qPCR.

4.1.2 Meio de Cultura e Crescimento

Para o crescimento dos clones de *E. coli* contendo os vetores pAT153BPV1, 2, 4, 5 e 6, foi utilizado o meio Luria-Bertani (LB: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%) acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina, como marcador de resistência para o crescimento das colônias bacterianas transformadas com o vetor pAT153.

4.1.3 Kits, Marcadores, Reagentes e Demais Materiais

Todos os reagentes utilizados para a preparação de soluções e meios foram adquiridos da **VETEC** química fina LTDA e da **MERCK** LTDA. Para extração de DNA foram utilizados Kit *Tissue and Blood DNA extraction* (Qiagen, Alemanha) e o *Invirsob*[®]

Spin Blood Mini (Invitex, Alemanha). Quanto às reações de PCR e qPCR, foram utilizados o GoTaq Green Master Mix kit (Promega Alemanha), e o QuantiFast™ SYBR® Green PCR (Qiagen, Alemanha), respectivamente. Os géis de agarose utilizados na eletroforese foram preparados na concentração de 2% em TAE (Tris-acetato- DietilAmina) 1X. Para aplicação do material no gel, foi utilizado tampão de amostra (Glicerol 50%, Azul de Bromofenol 0.2% e água miliQ como solvente); Para visualização do DNA no gel, o mesmo foi corado com solução de brometo de etídeo (0.5 µg/ml). O marcador λ Hind III (Invitrogen, Alemanha) foi utilizado como parâmetro para avaliação do DNA amplificado e o Marcador 100pb FastRuler DNA Ladder (Fermentas, Canadá).

4.1.4 Equipamentos

Estufa de cultura microbiana (Nova Ética®). Termociclador (MJ96G, Biocycler®); Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science); Micro-Centrífuga refrigerada (Vision®); Espectrofotômetro NanoVue Plus Spectrophotometer GE (Alemanha) ; Eppendorf® Concentrator plus; DNA-workstation UniEquip GmbH®; pHmetro PG1800 Gehaka®; Na eletroforese: fonte de tensão constante entre 0-500 Volts, transluminador de luz ultravioleta, máquina fotográfica digital, cubas horizontais OmniPhor®.

4.2 Métodos

4.2.1 Desenho de Iniciadores (*Primers*)

Para definição dos oligonucleotídeos específicos foram utilizados dados das sequências nucleotídicas dos genomas de BPV tipos 1, 2, 4, 5 e 6 depositadas no

Genebank. Regiões bem conservadas do gene L1 foram utilizadas para elaboração dos *primers* (Tabela 01). Para análise da complementaridade e eficiência dos *primers* (*forward* e *reverse*) foi utilizado o programa Oligo Analyser (www.idtdna.com). Os iniciadores liofilizados foram solubilizados em água ultra pura (Milli-Q) estéril para uma concentração estoque de 100 µM.

Tabela 01- Sequências dos *primers* para tipificação e detecção dos BPVs 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Tipo Viral	Primer – Sequência nt	Região/ Acesso GeneBank	Tamanho do Fragmento
BPV1	FBPV1qPCR 5'- GGC TGA GGA CGC TGC TGG TA -3' RBPV1qPCR 5'- TCT CCG AGC CCC CTC TGG TC -3'	Gene L1: 6305-6397 nt/ gij60965	92pb
BPV2	FBPV2qPCR 5'- AGC GCC TGG TTT GGG CTG TA -3' RBPV2qPCR 5'- GCA GAG CAT TAA AAG TGG GGT GCC -3'	Gene L1: 5874-5967 nt/ gij332996	93pb
BPV4	FBPV4qPCR 5'- AAC CTG AAC CAG CAC TCC CTG G -3' RBPV4qPCR 5'- GCC TAC GCT TTG GCG CCT TT -3'	Gene L1: 6978-7105 nt/ gij60862	127pb
BPV5	FBPV5qPCR 5'- AAA GCA GGG GAC TGT CCT CCC A -3' RBPV5qPCR 5'- CCA ATC ACA GGC CCC AAA GCC T -3'	Gene L1: 6089-6179 nt/ gij22901263	90pb
BPV6	FBPV6qPCR 5'- TGT GCC CAA GGT TTC TGG CAG T -3' RBPV6qPCR 5'- AGG CCC AAA CAA GGC GCT GA -3'	Gene L1: 5801-5923 nt/ gij40804501	122pb

4.2.2 Padronização das concentrações dos *Primers* e da PCR e qPCR

A padronização das técnicas de PCR e qPCR com os *primers forward* e *reverse* BPVqPCR foi realizada com os genomas de BPVs previamente clonados em vetor pAT153. Os genomas utilizados para determinação de carga viral e estabelecimento do limite de detecção da metodologia foram devidamente quantificados apresentando razão de absorvância A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0. As reações foram padronizadas levando em consideração os seguintes parâmetros: 1) Menor concentração de uso dos *primers*, que não comprometesse a reação; 2) Especificidade, através de reações com diferentes tipos de DNAs genômicos de BPVs. Para avaliar a especificidade de amplificação dos

primers foram cruzados diferentes DNA com cada iniciador. O DNA total de amostras da linhagem MDBK, não infectadas pelo BPV, foi utilizado como controle negativo.

As condições para amplificação do fragmento de L1 na PCR clássica foram: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto; 30 ciclos com: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de 60°C, para o BPV1qPCR, e 69°C, para todos os outros *primers*, por 30 segundos e extensão à 72°C por 40 segundos; Por fim, extensão final à 72°C por 2min. Todo o processo de amplificação por PCR foi realizado em tempo estimado de 1h25min. Após termino os amplicons foram submetidos à análise de eletroforese e foto-documentados.

O perfil térmico para reações de qPCR seguiu sugestão do fabricante do QuantiFast™ SYBR® Green PCR com algumas modificações: desnaturação do DNA e ativação da DNA polimerase por 5min a 95°C, seguido por 35-40 repetições de desnaturação por 10 segundos a 95°C e hibridização/polimerização por 20 segundos em temperatura de 60°C (BPV1qPCR) e 69°C (todos os outros primers); findados os ciclos, as amostras foram submetidas à análise de *melting* entre 75-90°C. Todo o procedimento de análise da qPCR foi estimado entre 45-55 minutos. Terminado o procedimento os arquivos da reação foram submetidos à visualização no software do equipamento e os amplicons submetidos à análise de eletroforese e foto-documentados.

4.2.3. Multiplex qPCR

Para os ensaios com BPV 1, 2, 4, 5 e 6 todos os pares de *primers* foram submetidos ao teste MULTIPLEX. Nessa reação todos os *primers* foram adicionados ao mesmo tubo, em duplicata, com quantidades equimolares de DNA dos BPVs clonados em pAT153.

4.2.4 Análise das Sequências Nucleotídicas e da qPCR

Para validar os amplicons, os mesmos foram utilizados, junto aos *primers* aqui desenhados, para o sequenciamento em ambos os sentidos. Deste modo, foram obtidas duas sequências para cada produto de PCR. Foi construída uma sequência consenso através do recurso CAP (*Contig Assembly Program*) do programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0. De posse das sequências depositadas no Genebank XO2346 (BPV-1), M20219 (BPV-2), XO5817 (BPV-4), AJ620206 (BPV-5) e AJ620208 (BPV-6) e do resultado do sequenciamento dos amplicons foi possível avaliar o grau de similaridade entre os analitos através da ferramenta de Blast disponível online em (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Para análise das reações de qPCR foi utilizado o Rotor-Gene 6000 Series Software version 1.7.87.

4.2.5 Preparação das amostras biológicas e extração de DNA

Foram utilizadas nos testes de detecção e tipificação amostras de lesões cutâneas e de sangue coletadas de animais com sintomatologia clássica de papilomatose bovina. Foram avaliadas 19 amostras de sangue de bovinos, coletadas em uma propriedade do Estado da Bahia, com e sem sintomatologia para infecção com *Papilomavírus bovino*. Também foram coletadas 36 amostras de verrugas cutâneas, de 23 bovinos, em uma propriedade leiteira localizada no Município de Ribeirão, no estado de Pernambuco. As lesões foram coletadas de diferentes locais do corpo do animal. As lesões, após coleta, foram acondicionadas em gelo seco e posteriormente imersas em nitrogênio líquido. As amostras de lesão cutânea (cerca de 30g) foram maceradas e submetidas à extração de DNA, seguindo o protocolo do fornecedor. Para as amostras de sangue cerca de 200µL

foram submetidos à extração de DNA total, seguindo protocolo do fabricante, e quantificado. O DNA coletado teve sua concentração padronizada em 60 ng/μL e 20ng/μL para ser utilizado diretamente nas técnicas de PCR e qPCR respectivamente.

4.2.6 Detecção Viral (PCR e qPCR)

As amostras de sangue e lesões cutâneas foram primeiramente avaliadas quanto à presença de BPV, utilizando *primers* genéricos MY11/MY09 (Manos *et al.*, 1989) e FAP59/FAP64 (Forslund *et al.*, 1999) para detecção geral de papilomavírus. Para a tipificação dos BPV 1 a 6 foram utilizados *primers* específicos desenvolvidos (FRBPVqPCR), assim como o sequenciamento dos fragmentos amplificados pelos *primers* MY e FAP.

As reações de tipificação por PCR seguiram o protocolo padronizado por Silva (2010), utilizando como padrão os genomas de BPVs clonados em pAT153. Para as reações qPCR cada amostra de DNA foi analisada em duplicata e o DNA padrão em triplicata como controle positivo. Os parâmetros utilizados na reação de qPCR foram: SYBR Green PCR Kit Qiagen 1x, *primers* Forward e Reverse BPVqPCR (0,4-0,6 μM), DNA molde (concentração de 2ng/μL) e quantidade de água ultra pura suficiente para 10μL de reação. Os produtos de amplificação da PCR (25μL) e qPCR (10μL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE ou TBE por 30-40 minutos em fonte de tensão estável. O material foi corado, visualizado e foto-documentado.

4.2.7 Limite de Detecção da qPCR

O limiar de detecção da técnica foi estabelecido mediante construção de uma curva padrão através de diluições seriadas 1:10 dos DNA clonados (construções pATBPV1, 2, 4, 5 e 6) em triplicata utilizando diluições da ordem de nanograma (10^{-9} g) até atograma (10^{-18} g). A concentração das amostras padrão foi determinada por espectrofotômetro e através da plataforma depositada no sítio <http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>, que determina a concentração de cópias de DNA padrão por microlitro através da correlação do número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$), o peso médio por pares de bases (650 Dalton) e a concentração do DNA em ng/ μ L.

5. Resultados

5.1 Padronização dos Iniciadores em PCR

Todos os *primers* foram padronizados por PCR. Os *primers* (*Foward* e *Reverse*) de tipificação possuem concentração de uso ideal entre 0,4 μM e 0,6 μM (pmol/ μL). Esses foram submetidos ao teste de especificidade de amplificação em reações de PCR clássica. Para cada par de iniciadores foram adicionados todos os DNAs dos *Papilomavírus bovinos* (tipos 1, 2, 4, 5 e 6) disponíveis no vetor pAT153, em tubos separados. Todos os testes foram elaborados com amostras em duplicata. Para o par de *primer* do FRL1BPV1qPCR (Figura 6) houve amplificação apenas das amostras que continha DNA de BPV1, em destaque, confirmando especificidade para tipificação e detecção.

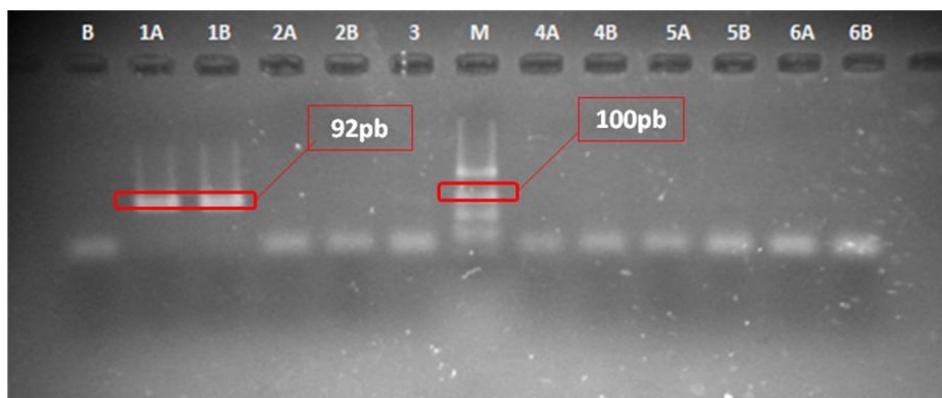


Figura 6: **Eletroforese de Teste Múltiplo PCR Para Iniciador FR L1BPV1qPCR**; Gel agarose 2%, TBE 1X, 140V, 14min. B- amostra sem DNA; 1A e 1B, BPV1; 2A e 2B, BPV2; 3, BPV3; M, Marcador 100pb Fermentas; 4A e 4B, BPV4; 5A e 5B, BPV5; 6A e 6B, BPV6.

Para os *primers* de FRL1BPV2qPCR, 4, 5 e 6 as condições ótimas de reação para amplificação específica foram semelhantes, sendo a temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos de 69°C muito próxima da temperatura de polimerização/extensão (72°C).

Na Figura 7 podemos observar a especificidade do *primer* FRL1BPV5qPCR, onde houve amplificação apenas no tubo contendo DNA de BPV 5. Confirmado por gerar fragmento em torno de 90pb (em destaque na Figura). Todos os pares de iniciadores apresentaram seletividade suficiente para detectar e tipificar os BPVs.

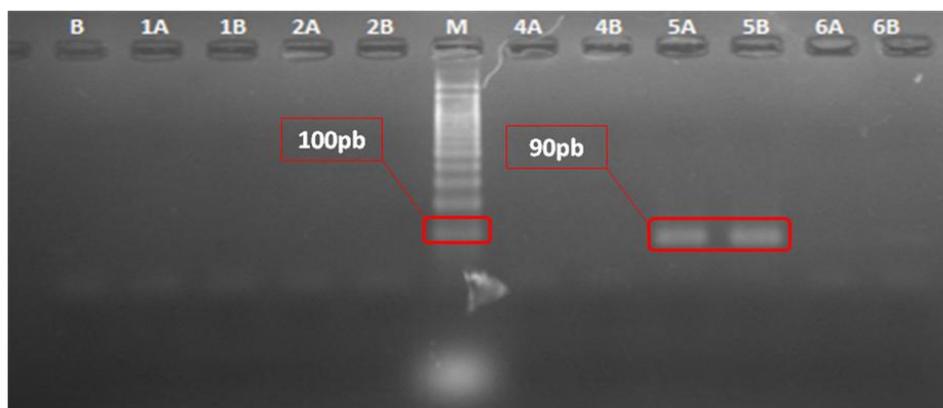


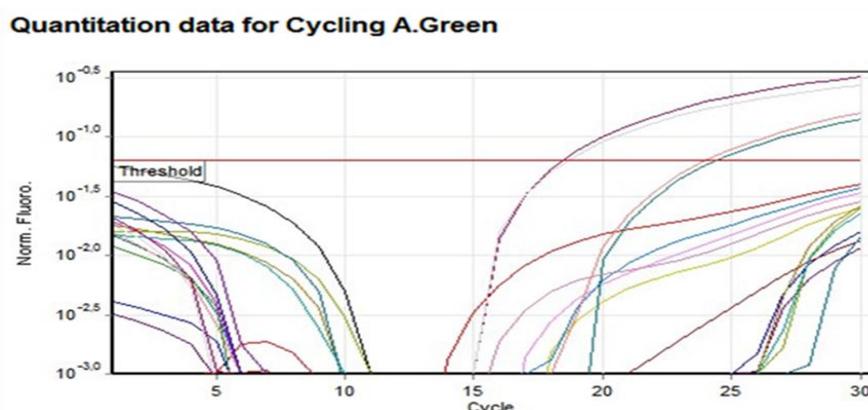
Figura 7: **Eletroforese de Teste Múltiplo Para Iniciador FRL1BPV5qPCR**; Gel agarose 2%, TAE 1X, 80V, 40min. M- marcador 100 pb DNA Ladder (Ludwig Biotec); 1A e 1B BPV1, 2A e 2B BPV2, 4A e 4B BPV4, 5A – 5B BPV5 6A e 6B BPV6; B- controle negativo da reação.

5.2 Padronização dos Iniciadores em qPCR

Na reação de qPCR os *primers* apresentaram especificidade, assegurando a detecção, tipificação e, sobretudo, a quantificação das amostras de BPV. Os iniciadores FRL1BPV1qPCR apresentaram 60°C como temperatura de anelamento/extensão ideal, já os pares de iniciadores dos outros tipos virais possuem temperatura ideal de 69°C (Tabela 02). A Figura 8 apresenta o resultado de uma análise de qPCR utilizando o par de iniciador FRL1BPV5qPCR e FRL1BPV6qPCR, destacando a amplificação dos fragmentos L1BPV5qPCR e L1BPV6qPCR através do registro da curva de quantificação (Cq) apenas nas amostras que continham DNA específico para aquele *primer*. Já a Figura 9 especifica a temperatura de *melting* dos oligonucleotídeos amplificados a partir dos iniciadores desenhados para BPV 5 e 6.

Tabela 02: Parâmetros dos *primers* para detecção/tipificação BPVs.

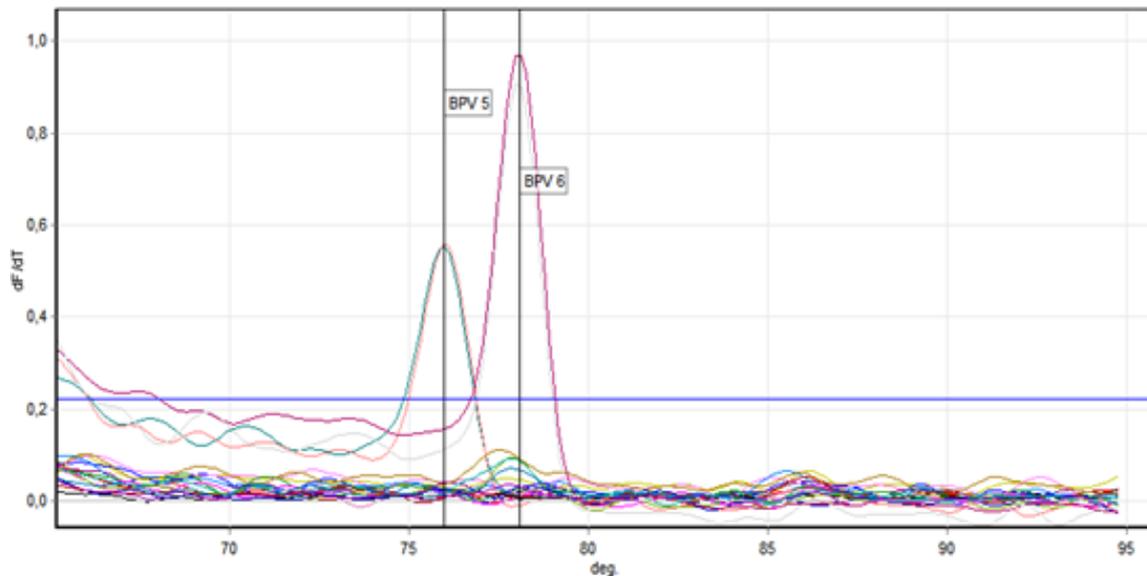
Papilomavírus Bovino	Primer	Conteúdo de GC	Tm	Tamanho do Fragmento
BPV1	FBPV1qPCR RBPV1qPCR	65.0 % 70.0 %	60°C	92pb
BPV2	FBPV2qPCR RBPV2qPCR	60.0 % 54.2 %	69°C	93pb
BPV4	FBPV4qPCR RBPV4qPCR	59.1 % 60.0 %	69°C	127pb
BPV5	FBPV5qPCR RBPV5qPCR	59.1 % 59.1 %	69°C	90pb
BPV6	FBPV6qPCR RBPV6qPCR	54.5 % 60.0 %	69°C	122pb



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (ng/ul)	Calc Conc (ng/ul)	% Var
1		BPV5 1A	Standard		100		
2		BPV5 1B	Standard		100		
3		BPV5 2A	Standard		100		
4		BPV5 2B	Unknown				
5		BPV5 4A	Unknown				
6		BPV5 4B	Unknown				
7		BPV5 5A	Unknown	24,44			
8		BPV5 5B	Unknown	24,04			
9		BPV5 6A	Unknown				
10		BPV5 6B	Unknown				
11		Branco	Unknown				
19		BPV6 1A	Unknown				
20		BPV6 1B	Unknown				
21		BPV6 2A	Unknown				
22		BPV6 2B	Unknown				
23		BPV6 4A	Unknown				
24		BPV6 4B	Unknown				
25		BPV6 5A	Unknown				
26		BPV6 5B	Unknown				
27		BPV6 6A	Unknown	18,45			
28		BPV6 6B	Unknown	18,64			
29		Branco	Unknown	NEG (NTC)			

Legenda: Ct ou Cq curva de quantificação; NEG (NTC) - Sample cancelled due to NTC Threshold; NEG- Sample cancelled as efficiency less than reaction efficiency threshold.

Figura 08: **Análise de Cq do Fragmento de L1BPV5qPCR e L1BPV6qPCR** . Em detalhe o ciclo em que foi ultrapassado a linha de quantificação, gerados pelo programa Corbett Rotor-Gene™6000, VS 1.7 (Build 87) qPCR.



No.	Colour Name	Genotype	Peak 1	Peak 2
1	Red	BPV5 1A		
2	Yellow	BPV5 1B		
3	Blue	BPV5 2A		
4	Purple	BPV5 2B		
5	Pink	BPV5 4A		
6	Light Blue	BPV5 4B		
7	Teal	BPV5 5A	76,00 (5)	
8	Light Red	BPV5 5B	76,00 (5)	
9	Green	BPV5 6A		
10	Magenta	BPV5 6B		
11	Black	Branco		
19	Pink	BPV6 1A		
20	Red	BPV6 1B		
21	Gold	BPV6 2A		
22	Light Green	BPV6 2B		
23	Teal	BPV6 4A		
24	Blue	BPV6 4B		
25	Dark Blue	BPV6 5A		
26	Purple	BPV6 5B		
27	Magenta	BPV6 6A	67,52	78,08 (6)
28	Light Grey	BPV6 6B	78,00 (6)	
29	Grey	Branco		

Bin Name	Temperature	Sample No.	Sample Name	Peak
5	75,97	7	BPV5 5A	76,0
		8	BPV5 5B	76,0
		Mean		76,00
			Std. Dev.	0,00
6	78,11	27	BPV6 6A	78,1
		28	BPV6 6B	78,0
		Mean		78,04
			Std. Dev.	0,04

Figura 09: **Análise de *Melting* do Fragmento de L1BPV5qPCR e L1BPV6qPCR.** Valores na coluna Peak 1 detalham os picos de *melting* dos oligonucleotídeos gerados pela reação qPCR, obtido pelo programa Corbett Rotor-Gene™6000, VS 1.7 (Build 87) qPCR.

Nas Figuras 08 e 09 é observada a amplificação e análise da temperatura de *melting* dos fragmentos de L1BPV5qPCR (90pb) e L1BPV6qPCR (122pb). Não há

contaminantes ou ampliações inespecíficas por estes pares de *primers*, evidenciado nos picos de *melting*, sendo L1BPV5qPCR a 76°C e L1BPV6qPCR a 78°C. As Figuras 10 e 11 apresentam valores estimativos das temperaturas de *melting* dos oligonucleotídeos propostos para identificação dos tipos virais BPV5 e BPV6. Esses foram obtidos pela software Oligocalc disponível on line: www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html.

Foi observado que as temperaturas de *melting* obtidas nos experimentos (Figuras 08 e 09) estão de acordo com a sugestão do Oligocalc (Fig 10 e 11). As reações qPCR apresentam valores de *melting* que permitem distinguir os amplicons/oligonucleotídeos gerados pela reação quantitativa em cadeia da polimerase. Esses resultados de identidade molecular também são observados para os oligonucleotídeos L1BPV1qPCR, L1BPV2qPCR e L1BPV4qPCR.

Enter Oligonucleotide Sequence Below
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Nucleotide base codes

AAA GCA GGG GAC TGT CCT CCC ATA GAA TTA AAG AAC AAG CCT ATT GAG GAC GGA GAT ATG
ATG GAT ATA GGC TTT GGG GCC TGT GAT TGG

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

CCA ATC ACA GGC CCC AAA GCC TAT ATC CAT CAT ATC TCC GTC CTC AAT AGG CTT GTT CTT
TAA TTC TAT GGG AGG ACA GTC CCC TGC TTT

5' modification (if any) 3' modification (if any) Select molecule
50 nM Primer 1 Measured Absorbance at 260 nanometers
50 mM Salt (Na⁺)

Calculate Swap Strands BLAST mfold

Physical Constants

Length: 90 Molecular Weight: 28049.3⁴ GC content: 47 %
1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm
is 0.979 microMolar⁵ and contains 27.5 micrograms.

Melting Temperature (T_M) Calculations

1 76.6 °C (Basic)
2 89.1 °C (Salt Adjusted)
3 77.79 °C (Nearest Neighbor)

Thermodynamic Constants Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.

RlnK 33.404 cal/(°K*mol) deltaH 742.8 Kcal/mol
deltaG 132.2 Kcal/mol deltaS 1952.7 cal/(°K*mol)

Deprecated Hairpin/self dimerization calculations

Figura 10: **Análise das Propriedades Físico-Químicas L1BPV5qPCR.** Análises estimadas pelo OLIGOCALC referente ao fragmento L1BPV5qPCR. Em detalhe o valor estimado para *melting* do fragmento amplificado pelo par de *primer* FRL1BPV5qPCR.

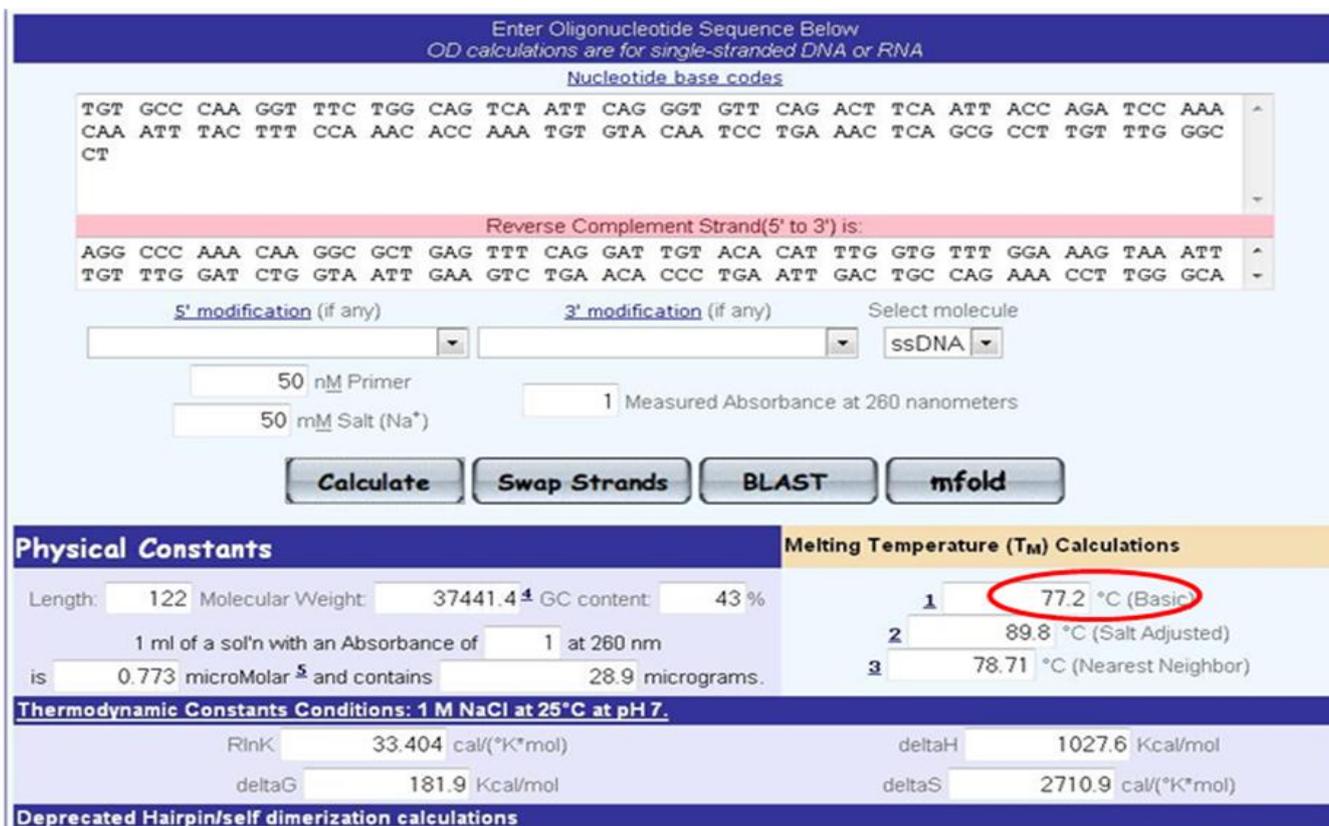
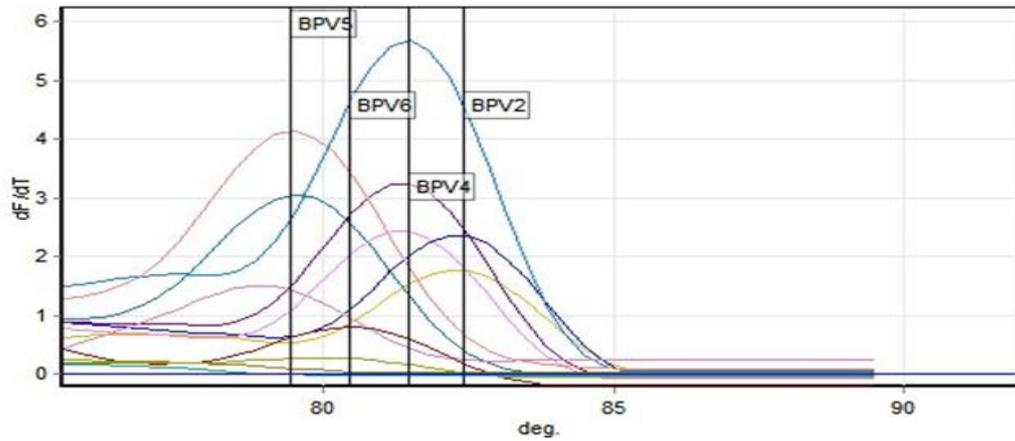


Figura 11: **Análise das Propriedades Físico-Químicas L1BPV6qPCR.** Análises estimadas pelo OLIGO CALC referente ao fragmento L1BPV6qPCR. Em detalhe o valor estimado para *melting* do fragmento amplificado pelo par de *primer* FRL1BPV6qPCR.

Além das confirmações para seletividade dos *primers* por PCR e qPCR, os amplicons/oligonucleotídeos formados pela reação com DNA clonados em pAT153 foram também submetidos ao sequenciamento e apresentaram para todas as sequências mínimo de 95% de identidade com as referências depositadas no *Genebank*, configurando subtipos virais.

5.2.1. Multiplex qPCR

Por apresentar temperaturas de anelamento/extensão semelhantes, TABELA 03, os pares de *primer* FRL1BPVqPCR (2, 4, 5 e 6) foram submetidos ao teste MULTIPLEX, apresentando perfil de curva como mostrado nas Figuras 12 e 13.



No.	Colour	Name	Genotype	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4
2	Yellow	BPV2		76,8	82,3 (BPV2)	87,0	89,0
3	Blue	BPV2		82,3 (BPV2)			
4	Purple	BPV4		77,2	81,3 (BPV4)		
5	Pink	BPV4		81,3 (BPV4)			
6	Light Blue	BPV4		77,5 (BPV5)	81,5 (BPV4)	87,0	
7	Teal	BPV5		79,5 (BPV5)	85,0	87,0	89,0
8	Red	BPV5		79,5 (BPV5)	87,0	89,0	
19	Light Purple	BPV5		79,0 (BPV5)	84,0 (BPV2)	86,0	88,0
20	Red	BPV6		80,5 (BPV6)			
21	Brown	BPV6		76,7	85,0	87,0	89,0
22	Green	BPV6		80,0 (BPV6)			
23	Teal	MDBK					
24	Light Blue	MDBK					
25	Blue	BRANCO					
26	Purple	BRANCO					

Bin Name	Temperature	Sample No.	Sample Name	Peak
BPV2	82,40	2	BPV2	82,3
		3	BPV2	82,3
		19	BPV5	84,0
			Mean	82,87
			Std. Dev.	0,80
BPV4	81,48	4	BPV4	81,3
		5	BPV4	81,3
		6	BPV4	81,5
			Mean	81,37
			Std. Dev.	0,09
BPV5	79,42	6	BPV4	77,5
		7	BPV5	79,5
		8	BPV5	79,5
		19	BPV5	79,0
			Mean	78,88
			Std. Dev.	0,82
BPV6	80,46	20	BPV6	80,5
		22	BPV6	80,0
			Mean	80,25
			Std. Dev.	0,25

Figura 12: Análise de *Melting* dos Oligonucleotídeos Gerados Pelo Multiplex dos Iniciadores L1BPVqPCR; Em detalhe os valores da temperatura de *melting* referente aos fragmentos L1BPV2qPCR, L1BPV4qPCR, L1BPV5qPCR e L1BPV6qPCR; genomas em triplicata e/ou duplicata clonado em vetor pAT153; MDBK-Madin-Darby Bovine Kidney Cells como controle negativo, Branco – mix contendo *primers* FRL1BPVqPCR 2, 4, 5 e 6 e água ultrapura disponibilizada pelo kit da reação.

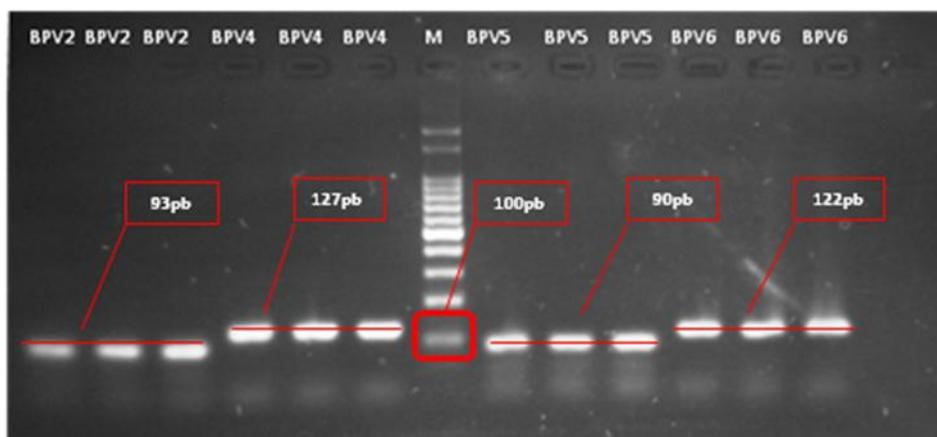


Figura 13: Eletroforese do teste Multiplex qPCR BPVs 2, 4, 5 e 6; M- marcador 100 pb DNA Ladder (Ludwig Biotec); BPV 2 genoma em triplicata clonado em vetor pAT153, BPV 4 genoma em triplicata clonado em vetor pAT153, BPV 5 genoma em triplicata clonado em vetor pAT153, BPV 6 genoma em triplicata clonado em vetor pAT153.

Nos experimentos de multiplex com amostras biológicas, não foi possível distinguir as curvas para os diferentes tipos virais. Assim, foram realizados testes reduzindo o número de *primers* utilizados no mix permitindo melhor discernimento das curvas dos experimentos e capacidade de tipificação das amostras. Assim a reação MULTIPLEX foi realizada com os iniciadores FRL1BPV2qPCR e FRL1BPV5qPCR. As Figuras 14 e 15 mostram amplificação dos oligonucleotídeos através da reação multiplex com esses iniciadores. A Figura 14 evidencia que a eletroforese não permite visualizar as diferenças para esses oligonucleotídeos e assim tipificar algumas amostras que apresentam amplicons com tamanhos muito próximos, sendo 93pb para o L1BPV2qPCR e 90pb para o L1BPV5qPCR.



Figura 14: **Eletroforese do Teste Multiplex qPCR BPV 2 e 5**; M- marcador 100 pb; BPV-2; BPV-5; A17 amostra coleta PE, A22 amostra coleta PE, MDBK como controle negativo e B – branco: mix contendo *primers* FRL1BPVqPCR 2 e 5 e água ultrapura disponibilizada pelo kit da reação.

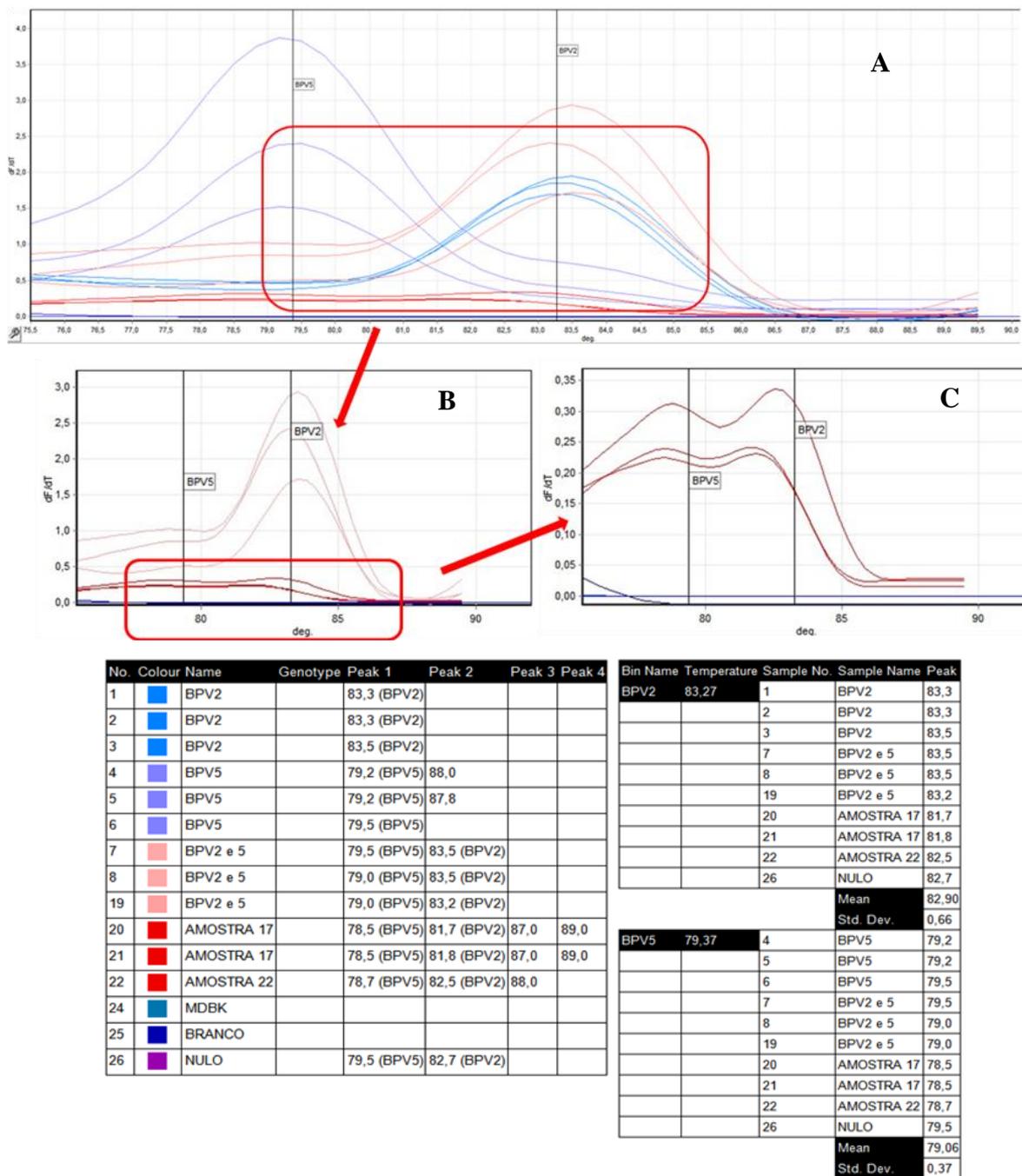


Figura 15: Análise de *melting* dos oligonucleotídeos gerados pela reação multiplex dos iniciadores L1BPVqPCR; Em detalhe os valores da temperatura de *melting* referente aos fragmentos L1BPV2qPCR e L1BPV5qPCR; Seta para baixo – Detalha região selecionada no Gráfico A; Seta para cima – Detalha região selecionada no Gráfico B. Genomas em triplicata e/ou duplicata clonado em vetor pAT153; MDBK - controle negativo, Branco – mix contendo *primers* FRL1BPVqPCR 2 e 5 e água ultrapura disponibilizada pelo kit da reação.

Na Figura 15 observam-se as curvas de *melting* referentes às amostras 17 e 22 (co-infectadas BPV2 e 5) que possuem mesmo perfil das curvas dos tubos contendo DNA do BPV2 e 5, simultaneamente, clonados em pAT153 . Nessa análise foi possível tipificar as amostras amplificadas na qPCR.

5.3 Genotipagem dos BPVs em Amostras Clínicas Por PCR e qPCR

Das 19 amostras de sangue de bovinos avaliadas, 14 foram positivas para BPV 2. Dessas 14, sete foram selecionadas (devido disponibilidade de material para os teste) para quantificação de carga viral através dos pares de *primer* FRL1BPV1qPCR e FRL1BPV2qPCR. Para as sete amostras foi observada presença de BPV2 e ausência de BPV1 (Tabela 03).

Tabela 03: Sintomas, expressão e quantificação viral de amostras de sangue de bovinos.

Amostras	Sintomas Clínicos	Deteção BPV1/2	Expressão E5	Expressão E2	Quantificação	Cq	Desvio
33	Assintomático	Positivo	Negativo	Negativo	1.065,4cópia/uL	0,72	-
40	Assintomático	Positivo	Positivo	Positivo	97,5 cópia/uL	28,6	0,72
41	Assintomático	Positivo	Positivo	Positivo	279,1 cópia/uL	27,54	0,13
43	Sintomático	Positivo	Positivo	Positivo	118,9 cópia/uL	27,8	0,12
44	Assintomático	Positivo	Negativo	Positivo	32,2 cópia/uL	29,7	0,20
47	Sintomático	Positivo	Negativo	Positivo	53,7 cópia/uL	29,2	1,84
55	Sintomático	Positivo	Negativo	Positivo	61,9 cópia/uL	29	0,77

Quantificação – média da quantificação das réplicas para cada amostra por FRL1BPV2qPCR; Cq – Curva de quantificação; Desvio – desvio padrão;

Nas 36 amostras de verrugas cutâneas de Pernambuco, 97,2%, ou seja 35, apresentaram infecção por BPV. Dessas amostras quatro (17,19, 22 e 30) foram avaliadas quanto co-infecção para BPV 1, 2, 4, 5 e 6. Foram observadas infecções

simultâneas onde há presença de BPV2 em 2 delas (17,22), BPV4 em 3 delas (17, 22,30), BPV5 nas 3 amostras (17, 22,30) e BPV6 em 2 delas (17,22), quanto ao BPV1 não foi relatada a presença de cópias de L1 nas amostras. Na amostra 19 não foi possível observar infecção por nenhum tipo viral aqui estudado. As amostras de lesões cutâneas apresentaram co-infecção de BPV5 e BPV4 (amostras 17, 22,30). Já para as amostras 17 e 22 houve co-infecção de BPV2, 4,5 e 6.

5.4 Limite de Detecção e Determinação de Carga Viral por PCR e qPCR

Através das reações de qPCR e PCR clássica com todos os pares de iniciadores aqui estudados FR L1BPVqPCR 1, 2, 4, 5 e 6, foram determinadas a carga viral presente nas amostras biológicas. O limiar da detecção foi de 4fg de DNA, em torno de 40 cópias de DNA de BPV por microLitro (μL) para as reações de qPCR, já para reações de PCR clássica foi possível observar através da análise de eletroforese um limiar cerca de 1000x menos sensível, algo em torno de 4pg-400fg, ou 40000-4000cópia/ μL . Na Figura 16 observa-se o limite de detecção para o par de *primer* FRL1BPV1qPCR em reação de PCR clássica, através de um experimento utilizando uma escala de diluição 1:10 do genoma padrão de BPV1, partindo de 4ng (40×10^6 cópias/ μL) até 4fg (4×10^1 cópias/ μL). É possível observar claramente amplificação até 400fg para este par de iniciadores, correspondendo a 4×10^3 cópias/ μL .

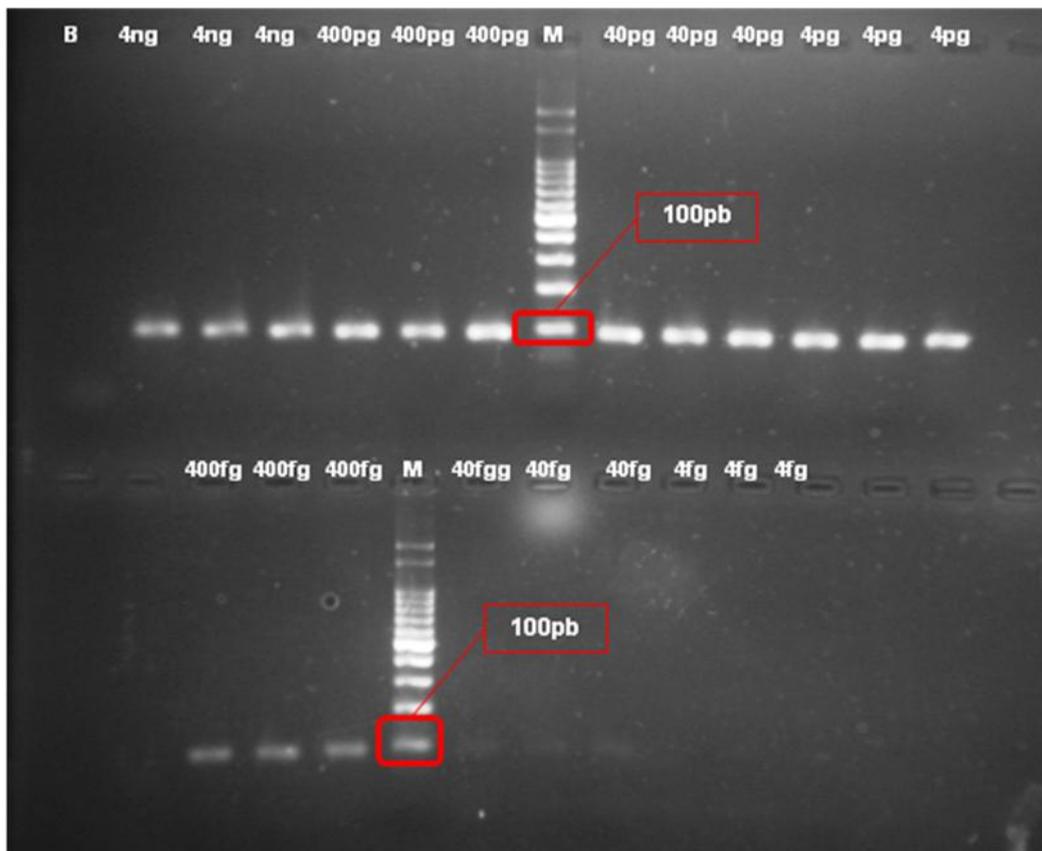
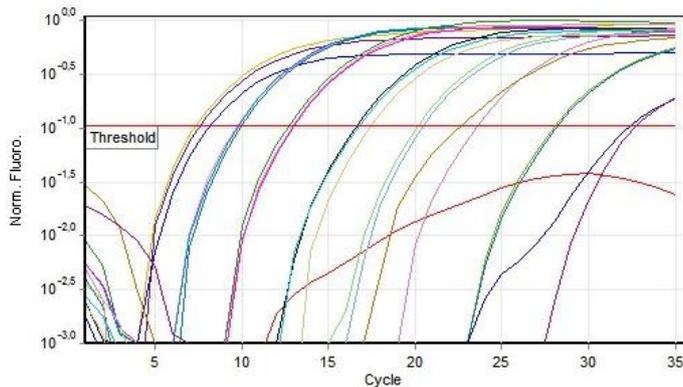


Figura 16: **Eletroforese PCR Clássica Com Iniciador FRL1BPV1qPCR – Limite de Detecção**; M- marcador B – branco da reação; Amostras em triplicata, utilizando escala de diluição 1:10 partindo de 4ng até 4fg.

Na Figura 17 observa-se o limiar de detecção entre 4fg e 400ag para o par de *primer* FRL1BPV1qPCR em reação de qPCR. Neste experimento utilizou-se uma escala de diluição 1:10 do genoma padrão de BPV1, partindo de 4ng (40×10^6 cópias/ μ L) até 400ag (4 cópias/ μ L). É possível observar claramente registro de Cq (amplificação) até 400ag para este par de iniciadores, correspondendo a 4 cópias/ μ L.



Quantitation Information

Threshold	0,1044
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	conc= 10 ^{-(0,282*CT + 9,350)}
Standard Curve (2)	CT = -3,541*log(conc) + 33,111
Reaction efficiency (%)	0,91591 (* = 10 ^{-(1/m) - 1})
M	-3,54139
B	33,11072
R Value	0,99466
R ² Value	0,98934
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	0%
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

No.	Colour Name	Type	CT	Given Conc (copies/μl)	Calc Conc (copies/μl)	% Var
1	Branco	NTC				
2	BPV1 4ng	Standard	7,36	32.000.000,0	18.717.719,5	41,5%
3	BPV1 4ng	Standard	8,18	32.000.000,0	10.992.146,5	65,6%
4	BPV1 4ng	Standard	7,59	32.000.000,0	16.089.759,5	49,7%
5	BPV1 400pg	Standard	9,72	3.200.000,0	4.024.463,9	25,8%
6	BPV1 400pg	Standard	9,78	3.200.000,0	3.871.337,3	21,0%
7	BPV1 400pg	Standard	9,96	3.200.000,0	3.441.100,4	7,5%
8	BPV1 40pg	Standard	12,91	320.000,0	504.649,2	57,7%
9	BPV1 40pg	Standard	12,70	320.000,0	579.596,9	81,1%
10	BPV1 40pg	Standard	13,01	320.000,0	475.641,3	48,6%
11	BPV1 4pg	Standard	16,60	32.000,0	45.973,0	43,7%
12	BPV1 4pg	Standard	16,74	32.000,0	41.963,9	31,1%
13	BPV1 4pg	Standard	17,42	32.000,0	26.966,2	15,7%
14	BPV1 400fg	Standard	20,17	3.200,0	4.517,2	41,2%
16	BPV1 400fg	Standard	20,44	3.200,0	3.776,4	18,0%
19	BPV1 40fg	Standard	23,58	320,0	491,2	53,5%
21	BPV1 40fg	Standard	22,65	320,0	901,9	181,8%
22	BPV1 4fg	Standard	28,06	32,0	26,7	16,6%
24	BPV1 4fg	Standard	28,19	32,0	24,6	23,2%
25	BPV1 400ag	Standard	32,43	3,2	1,6	51,2%
27	BPV1 400ag	Standard	32,74	3,2	1,3	60,1%

Standard Curve

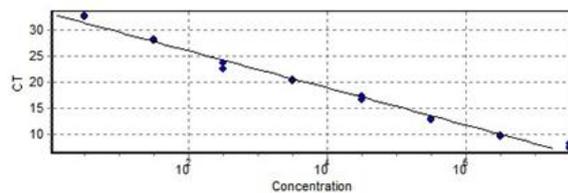


Figura 17: **Limite de Detecção qPCR Iniciador FRL1BPV1qPCR**; Curva de quantificação avaliada pelo software Rotor-GeneTM 6000, VS 1.7 (Build 87), mostrando amplificação do genoma BPV1 clonado no vetor pAT153 em diluições seriadas 1:10, amostras em triplicata para cada concentração do genoma adicionado na reação, partindo de 4ng-400ag; Branco – reação sem DNA BPV (*No Template Control*).

As análises de limiar de detecção para o par de iniciadores FRL1BPV1qPCR nos fornecem valores de teste de hipóteses, $R^2=0,99$, junto do valor de eficiência da reação, 0,92, que asseguram a seletividade da reação. Todos os outros iniciadores FRL1BPVqPCR 2, 4, 5 e 6, mostraram limiar de detecção entre 40-4fg, ou 400-40 cópias/μL.

Nas determinações de carga viral presentes em amostras de lesões cutâneas observamos BPV2 100-20000 cópias/μL, BPV4 3700-22000 cópias/μL, BPV5 500-4000 cópias/μL, BPV6 350-8000 cópias/μL. Nas amostras de lesão cutânea avaliadas foi

possível observar que há uma alta taxa de co-infecção onde as amostras 17, 22 e 30 apresentaram BPV5 (500-4000 cópias/ μ L) e BPV4 (3700-20000 cópias/ μ L) infectando-as simultaneamente.

As amostras de sangue de bovinos com sintomatologia para BPV que foram submetidas a análise de carga viral para BPV1 e BPV2, apresentaram para BPV2 de 14 a 310 cópias/ μ L do gene L1 dentro das 7 amostras avaliadas, já para BPV1 há significativa diminuição na quantidade de cópias/ μ L não ultrapassando 4 cópias/ μ L.

6. Discussão

A papilomatose bovina representa um grave problema econômico do ponto de vista pecuário. Possui distribuição mundial e no Brasil representa um prejuízo econômico para os criadores atingindo em casos extremos até 75% dos bovinos de uma criação (Iglesias & Brito, 2004). Em observações do nosso grupo pudemos relatar que muitos animais infectados em fazendas de gado para produção de leite e seus derivados, assim como gado para corte têm apresentado infecções persistentes (Silva *et al.*, 2012). Os BPVs também infectam outras espécies de animais além dos bovinos como equinos, girafas, búfalos e felinos, promovendo graves problemas (Bogaert *et al.*, 2005; van Dyk *et al.*, 2011; Somvanshi R, 2011; Silva *et al.*, 2012).

Em vista das metodologias disponíveis para tipificação e detecção do BPV demandarem período de tempo demasiado na realização do procedimento e apresentarem reações cruzadas com outros organismos relacionados, uma das opções mais promissoras de diagnóstico do vírus é a reação quantitativa em tempo real de cadeia da polimerase (qPCR) por ser uma ferramenta de destaque na detecção, tipificação e quantificação de nucleotídeos alvos e, ainda possibilitar a avaliação da carga viral de diferentes infecções na prática clínica (Nasir *et al.*, 2007 & Wittwer *et al.*, 2009).

A detecção de BPV, não só em bovinos, mas a triagem desses vírus que causam infecções em outros animais necessita de uma metodologia que se faça mais robusta e completa. Como cita Carvalho *et al.*, (2012) um programa de vigilância que identifique a prevalência, a incidência e a distribuição da papilomatose bovina é imprescindível para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e de prevenção, assim como o estabelecimento futuro de métodos confiáveis de diagnósticos.

Muitos estudos disponíveis lançaram mão do uso de primers degenerados para detectar infecção pelos BPVs. O uso desses, proporcionam alguns prejuízos à análise por acarretar diminuição da sensibilidade do procedimento, o que prejudica análises da presença e ausência da infecção e de co-infecção (Silva *et al.*, 2012). A detecção do *Papilomavírus bovino* em células brancas do sangue de equinos foi recentemente permitida através de PCR tendo como alvo o gene E5 (Stanek *et al.*, 2008). Até então, havia uma escassez de dados a respeito da presença de genomas virais dos *Papilomavírus bovinos* em sangue de equídeos, o que poderia estar relacionado à quantidade de vírus presente neste tipo de fluido, além do limite de detecção das metodologias disponíveis (Angelos *et al.*, 1991; Nasir *et al.*, 1997; Bogaert *et al.*, 2008). No estudo de Stanek e colaboradores em 2008 é empregada técnica de PCR para detecção de BPV em equídeos com um limite de detecção (LOD) de 10cópias/ μ L, semelhante ao alcançado neste trabalho. Essa metodologia, porém, não permite quantificar as amostras e lança mão da subjetividade da observação humana de géis de eletroforese para liberação dos resultados.

Por estarem intimamente mais envolvidos nos relatos de infecção em bovinos e equinos, os papilomavírus tipo 1 e 2 foram aqui abordados, junto aos 4, 5 e 6, também muito frequentes nos relatos bibliográficos (Nasir *et al.*, 2008; Bogaert, 2008). O BPV 1 e BPV 2 são os principais agentes de fibropapilomas cutâneos, causando diversos prejuízos nos plantéis de bovinos e estão envolvidos na patogênese das lesões cutâneas denominadas sarcóides que frequentemente afetam equinos (Stanek *et al.*, 2008). Já os BPV 4, 5 e 6 causam papilomas do epitélio do trato digestório, fibropapilomas em forma de grão de arroz no úbere, e papiloma epitelial de tetos, sendo esses tipos muito importantes economicamente por trazerem perdas significativas na produção de carne e leite (Bloch, 1997; Campo, 1997; Schuch, 1998; Van Regenmortel *et al.*, 2000; Hatama *et al.*, 2011). Deste modo, neste estudo, foi elaborado um teste diagnóstico através da qPCR

não só para detectar, como para tipificar e quantificar os tipos mais relevantes de BPVs (1, 2, 4, 5 e 6).

Os iniciadores desenvolvidos para detectar, genotipar e quantificar os BPV 1 e 2, apesar de não possuírem perfil térmico semelhante nas reações de qPCR, contam com um limiar de detecção semelhante e animadores . Os níveis de quantificação estão entre 4fg e 400ag para os pares de *primer* FRL1BPV1qPCR e FRL1BPV2qPCR em reação de qPCR, o que corresponde a 4 cópias/ μ L.

A escolha da reação quantitativa em tempo real de cadeia da polimerase com SybrGreen ocorreu, por ser uma metodologia similar, em princípio à PCR, que já está bastante disseminada no campo do diagnóstico molecular (Bustin AS, 2000 & Kubista *et al.*, 2006). A qPCR ainda demonstra sensibilidade analítica superior quando comparada ao sequenciamento, especialmente para detecção de amostras com múltiplas infecções. Além da praticidade e sensibilidade já conhecidas na PCR comum, na qPCR, o resultado é obtido assim que terminado o procedimento no equipamento, agilizando a análise dos resultados (*Gasthuys et al.*, 2008).

A análise de eletroforese se faz desnecessária nos procedimentos de qPCR já padronizados, visto que os equipamentos permitem utilizar a ferramenta de HRM (High Resolution *Melting*) que nos fornece análise detalhada dos oligonucleotídeos formados pela reação. Porém foi necessária a realização desta técnica durante os procedimentos de qPCR, por esta ser utilizada como metodologia complementar que auxilia na validação de novos procedimentos, junto ao sequenciamento.

Ao observar as temperaturas de hibridização dos oligonucleotídeos L1BPV1qPCR de 60°C e L1BPVqPCR 2, 4, 5 e 6 de 69°C, percebemos quão elevadas se apresentaram, ficando muito próximo à temperatura ideal de polimerização para as enzimas DNA polimerase usualmente utilizadas nos KITS comerciais de PCR (72°C). A melhor

temperatura de hibridização é obtida apenas através de experimentos e otimização, enquanto a temperatura de *melting*, utilizada para tipificar as amostras, é intrínseca a cada sequência nas diferentes condições de pH e osmolaridade. É possível estimar esse valor através de programas computacionais baseado na sequência, concentração dos *primers* e potencial osmótico no meio reacional (Janes & Chen, 2002).

Devido às características físico-químicas dos iniciadores, o passo de polimerização/extensão foi omitido, por associar esse ao de anelamento, tornando o método mais breve, ocasionando um menor desgaste do equipamento, menos consumo de energia, e maior produtividade por hora de trabalho. Isso se torna bastante importante no uso por parte dos laboratórios de análises clínicas.

A proximidade das temperaturas de despolimerização entre os *primers* desenvolvidos permite a realização de testes MULTIPLEX. Esses expandem as aplicabilidades das análises de qPCR (Klapper *et al.*, 2000 & Elenitoba-Johnson *et al.*, 2001). Como cita Elenitoba-Johnson *et al.* (2001) o MULTIPLEX não se torna enfraquecida pela análise de quantificação de múltiplos alvos em um único tubo, e não sofre interferência quanto a eficiência da reação e limite de detecção. Isto se torna bastante importante quando alvos pouco concentrados são amplificados em mesmo tubo com outros alvos de alta concentração (Wittwer *et al.*, 2009). As análises aqui elaboradas, porém, não obtiveram resultados que permitissem tipificar todos os tipos virais em uma única análise multiplex, permitindo apenas MULTIPLEX para os *primers* FRL1BPV2qPCR e FRL1BPV6qPCR. Essa incompatibilidade pode ser devida limitação do intercalante de DNA para detecção, SybrGreen[®], por este não possuir um padrão único de intercalação no dsDNA (doble strand DNA), promovendo curvas de *melting* com variabilidade que interfere nas tipificações (Elenitoba-Johnson *et al.*, 2001). Uma alternativa para essa problemática seria utilização de outro tipo de agente intercalante com o EvaGreen, que vem sendo utilizado em testes de HRM (Hight Resolution *Melting*) para avaliar

polimorfismos de nucleotídeo único (SNP - *Single Nucleotide Polimorfism*). Este possui um padrão de intercalação no dsDNA que permite construção de curvas de *melting* com reduzidas variabilidades (Wagner *et al.*, 2005).

Apesar da impossibilidade de realização do MULTIPLEX com todos os iniciadores em único tubo, como alternativa pode-se tipificar as amostras para diferentes tipos virais (BPV 2, 4, 5 e 6) ao mesmo tempo, desde que os ensaios sejam realizados em tubos separados. Essa possibilidade associada à quantificação das amostras através da importação das curvas de quantificação de bancos de dados, necessárias para determinação da carga viral presente na amostra, se torna atraente do ponto de vista do diagnóstico molecular dos BPVs. Assim em reações com valores de eficiência semelhantes será permitido importar curvas de um banco de dados elaborado no próprio laboratório, promovendo a determinação da carga viral e não apenas a detecção e tipificação. Vale ressaltar que os iniciadores aqui desenvolvidos podem ser utilizados nas reações clássicas de PCR, como relatado a cima. Assim o emprego desses *primers* poderá atender tanto aos laboratórios que adquirirem algum equipamento de qPCR, ou os que preferirem utilizar termocicladores para PCR convencional.

O limite de detecção da metodologia aqui desenvolvida se mostra superior aos poucos relatos da literatura referente a *Papilomavírus bovino*, enquanto se aproxima bastante dos utilizados para detecção de outros tipos de vírus infectante de diversos outros animais, possuindo como diferença a quantidade de material utilizado no procedimento que em média é de 25µL/reação e aqui utilizamos 10µL/reação em cada tubo (Dwyer *et al.*, 2010; Ulrich *et al.*, 2006; Somvanshi *et al.*, 2011; Somvanshi *et al.*, 2010 & Adler-Storhiz *et al.*, 2007).

Apesar da padronização dos iniciadores terem sido elaboradas a partir de diferentes kits de diferentes empresas, consequentemente com enzimas distintas e conteúdo variado, para testes de qPCR o Quantifast Sybr Green PCR Master Mix contendo HotStar

Taq[®] Plus DNA polymerase da Qiagen e na PCR clássica o kit da Promega[®] contendo Taq DNA Polymerase extraída de bactéria, não seria possível relacionar diretamente o limite de detecção entre as duas técnicas. Porém é possível afirmar que a sensibilidade na avaliação, através do software do equipamento da qPCR é muito mais acurada, quando comparada à visualização dos géis de agarose utilizados em eletroforese para liberação de resultados da PCR clássica. Sem contar que mesmo lançando mão de ferramentas espectrofotométrica para avaliação da eletroforese, o custo total e o tempo decorrido para tais procedimentos trazem alguns ônus ao uso dos iniciadores na PCR clássica.

A presença simultânea de mais de um tipo de *Papilomavírus bovino* em uma única lesão está de acordo com relatos anteriores, assim como a presença do material genético em sangue, este, porém, nunca foi quantificado (Freitas *et al.*, 2003 & Wosiacki *et al.*, 2005). Como mostrado aqui, o DNA viral foi detectado, tipificado e quantificado em amostras de sangue e epiderme, provavelmente em múltiplas cópias episomais, como relatam outros estudos (Somvanshi *et al.*, 2011).

Como foram realizados testes com qPCR SybrGreen em poucas amostras (n=11) não foi possível elaborar uma avaliação que permitisse comparar a carga viral com grau de lesão e que possuísse validade estatística. O enfoque desse trabalho trata apenas da viabilidade da utilização dos iniciadores desenhados para detectar, tipificar e quantificar os *Papilomavírus bovino* 1, 2, 4, 5 e 6. Através da análise dos resultados sumarizados na Tabela 03 fica claro que alguns animais que não apresentavam nenhum sinal clínico de infecção pelo BPV, possuíam genoma dos papilomavírus nas amostras analisadas.

À primeira vista, as tipificações permitirão uma diminuição de tempo e gasto para traçar perfil epidemiológico em criação de bovinos. Permitirá também avaliar a carga viral em determinados bovinos, sendo uma ferramenta diagnóstica eficaz no combate a infecção pelos *Papilomavírus bovinos*. Contribuirá também como ferramentas para os

órgãos de defesa sanitária como metodologia de escolha ou auxiliar no diagnóstico da infecção pelos BPVs.

O teste aqui desenvolvido apresenta total concordância com os resultados de tipificação dos *primers* utilizados em PCR clássica, além de promover detecção, tipificação e quantificação acurada de 3×10^8 à 3×10^1 cópias/ μ L. Isto é bastante importante quando utilizado para quantificar carga viral em diferentes tipos de amostras clínicas, de diferentes animais. Pois como observado nas quantificações realizadas, as amostras de lesão cutânea apresentaram ao menos carga de 1000 cópias/ μ L. Essa metodologia desenvolvida permitirá o desenvolvimento de vários estudos concernentes à infecção por *Papilomavírus bovino* acometendo tanto os bovinos como equinos. Também poderá auxiliar no entendimento da infecção e na sugestão de medidas para prevenir a propagação da infecção entre animais em um mesmo rebanho e entre diferentes Estados.

7. Conclusão

Os iniciadores aqui desenvolvidos se mostraram promissores para o diagnóstico da infecção pelos BPVs tipo 1, 2, 4, 5 e 6. Por possuir um limiar de detecção entre 40 cópias/PCR e o limite teórico de 3 cópias/PCR os *primers* FRL1BPVqPCR promovem confiável e sensível detecção dos BPVs, tipificação e quantificação da carga viral em diferentes tipos de amostras. O conhecimento dos tipos de BPV circulantes é bastante importante por conduzir estratégias de controle e prevenção da disseminação do BPV em bovinos e em outros animais. Assim a metodologia possui particular importância por apresentar especificidade elevada e permitir estudos epidemiológicos da infecção pelo BPV. Este trabalho também contribui para validação da PCR em tempo real em diagnóstico da papilomatose bovina, com aplicações práticas no monitoramento por veterinários da eficácia das futuras vacinas.

8. Referências Bibliográficas

Adler-Storthz K, Scheurer ME, Dillon LM, Chen Z, Follen M (2007) Absolute quantitative real-time polymerase chain reaction for the measurement of human papillomavirus E7 mRNA in cervical cytobrush specimens. *Infectious Agents and Cancer*, 2:8.

Amtmann E, Muller H, Sauer G (1980) Equine connective tissue tumours contain unintegrated bovine papilloma virus DNA. *J. Virol.* 35, 962–964.

Angelos JA, Marti E, Lazary S, Carmichael LE (1991) Characterization of BPV-like DNA in equine sarcoids. *Arch Virol* 119, 95–109.

Antonsson A & Hansson BG (2002) Healthy skin of many species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *J. Virol.* 76 (24):12537-12542.

Antonsson A, Karanfilovska S, Lindqvist P and Hansson BG (2003b) Genral acquisition of human skin papillomavirus infections occurs in early infancy. *J Clin Microbiol* 41: 2509 – 2514.

Antosson A, Erfurt C, Hazard K, Holmgren V, Simon M, Kataoka A, Hossain S, Hakangard C and Hansson BG (2003a) Prevalence and type spectrum of human papillomaviruses in the healthy skin samples collected in three continents. *J Gen Virol* 84: 1881 – 1886.

Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C, Brown JC (1991) Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophysical Journal*, v. 60, p. 1445-1456.

Bernard H-U (2006) Phylogeny and taxonomy of papillomaviruses. In Campo M S (ed.) *Papillomavirus research: natural history to vaccines and beyond*. Caister Academic Press, Norfolk: 11–17.

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 401, 70–79.

Bernard PS, Wittwer CT (2002) Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clin Chem*;48:1178–85.

Bloch N, Sutton RH, Breen M, Spradbrow PB (1997) Identification of papillomavirus in scrapings from bovine warts by use of the polymerase chain reaction. *Veterinary research Communications* 21: 63 – 68.

Bogaert L, Martens A, De Baere C & Gasthuys F (2005) Detection of bovine papillomavirus DNA on the normal skin and in the habitual surroundings of horses with and without equine sarcoids. *Res Vet Sci* 79, 253–258.

Bogaert L, Martens A, Van Poucke M, Ducatelle R, De Cook H, Dewulf J, De Baere C, Peelman L & Gasthuys F (2008) High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin of equine sarcoid-affected and healthy horses. *Vet Microbiol* (doi:10.1016/j.vetmic.2007.11.008).

Borzacchiello G & Roperto F (2008) *Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle*. *Vet. Res.* 39: 45.

Borzacchiello G *et al.*(2003) Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. *J. Gen. Virol.* 84:2921-6.

Brandt S, Haralambus R, Shafti-Keramat S, Steinborn R, Stanek C, Kirnbauer R, Brandt S (2008) A subset of equine sarcoids harbour BPV-1 DNA in a complex with L1 major capsid protein. *Virology* 375, 433–441.

Buck CB, Thompson CD, Pang YS, Lowy DR, Schiller JT (2005) Maturation of papillomavirus capsids. *Journal of Virology*, v. 79, n. 5, p. 2839-2846.

Bustin SA (2000) Absolute quantification of Mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25:169 –93.

Bustin SA, Mueller R (2005) Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*;109: 365–79.

Campo MS & Coggins L W (1982) Molecular Cloning of Bovine Papillomavirus Genomes and Comparison of Their Sequence Homologies by Heteroduplex Mapping. *J. gen. Virol.*, 63, 255-264.

Campo MS (1997) *Bovine papillomavirus and cancer*. *Vet J* 154: 175-/188.

Campo MS (1998) *Persistent infection by bovine papillomavirus*. In: Ahmed, R., Chen, I.S.Y. *Persistent Viral Infections*. Wiley, pp. 503-516.

Campo MS (2002) *Animal models of Papillomavirus Pathogenesis*. *Virus Research* 89: 249-261.

Campo MS (2003) *Papillomavírus and disease in humans and animals*. *Vet Comp Oncol* 1: 3-14.

Campo MS (2006) *Bovine papillomavirus: old system, new lessons?* (Eds) *Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond*. Caister Academic Press, Wymondham, Chap 23.

Campo MS, Jarrett WF (1986) Papillomavirus infection in cattle: viral and chemical cofactors in naturally occurring and experimentally induced tumours. Ciba Found Symp., Chichester, n.120, p.117-135.

Carvalho C, Freitas AC, Bruner O, Góes LGB, Yagui-Cavalcanti A, Beçak W, Stocco doas Santos RC (2003) Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. Braz J Microbiol, 34: 82-84.

Carvalho CCR, Batista MVA, Silva MAR, Balbino VQ, FREITAS AC (2012) Detection of Bovine Papillomavirus Types, Co-Infection and a Putative New BPV11 Subtype in Cattle. TRANSBOUND EMERG DIS, v. 9, p. no-no.

Claus MP, Lunardi M, Alfieri AA, Otonel RAA, Sartori D, Fungaro MHP, Alfieri AF (2009) Multiple bovine papillomavirus infections associated with cutaneous papillomatosis in Brazilian cattle herds. Braz Arch Biol Technol., 52: 93-98.

Claus MP, Vivian D, Lunardi M, Alfieri AF, Alfieri AA (2007) Phylogenetic analysis of bovine papillomavirus associated with skin warts in cattle herds from the state of Paraná. Pesq Vet Bras, 27: 314-318.

Dawra RK and Sharma OP (2001) Enzootic bovine haematuria: past, present and future (A review). Vet. Bull. 71, 1–27.

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

Dejucq N & Jégou B (2001) Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. Microbiol Mol BioL Rev 65(2):208-231.

Diniz N, Melo TC, Santos JF, Mori E, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Freitas AC, Beçak W, Carvalho RF, Stocco RC (2009) Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil. Genet Mol Res, 8: 1474-1480.

Dwyer DE, Lay MJ, Lucas RM, Ratnamohan M, Taylor J, Ponsonby A (2010) Measurement of Epstein-Barr virus DNA load using a novel quantification standard containing two EBV DNA targets and SYBR Green I dye. Virology Journal, 7:252.

Elenitoba-Johnson KS, Bohling SD, Wittwer CT, King TC (2001) Multiplex PCR by multicolor fluorimetry and fluorescence *melting* curve analysis. Nat Med;7:249 –53.

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

Finlay M, Yuana Z, Burdenb F, Trawfordb A, Morgana Iain M., M. Campoa S, Nasir L (2009) The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. *Virus Research* 144 315–317.

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

Freitas AC, Carvalho C, Brunner O, Birgel Jr. EH, Libera AMD, Benesi FJ, Beçak W and Stocco dos Santos RC (2003) Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the vírus: a discussion about BPV-1. *Braz J Microbiol* 34: 76-78.

Freitas AC, Silva MAR, Carvalho CCR, Birgel Jr EH, Santos JF, Beçak W and Stocco dos Santos RC (2007) Papillomavirus DNA detection in non epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus. *Communicating Current research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.

Freitas AC, Silva MAR, Jesus ALS, Mariz FC, Cordeiro MN, Albuquerque BMF and Batista MVA (2011) Recent insights into Bovine Papillomavirus. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(33), pp. 6004-6012.

Gaukroger J, Chandrachud L, Jarret WFH, Mc Garvie GL, Yeudall WA, McCaferry RE, Smith KT and Campo MS (1991) Malignant transformation of a papilloma induced by bovine papillomavirus type 4 in the nude mouse renal capsule. *Society for General Microbiology* 72: 1165 – 1168.

Gissman L, Pfister H, zur hausen H (1977) Human papillomaviruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology*, v. 76, p. 1310-1313.

Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, and Apple RJ (2000) Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 38: 357 – 361.

Gross GE & Barrasso R (1999) Infecção por Papilomavírus Humano – Atlas Clínico de HPV. Porto Alegre: Artmed. p. 45.

Hatama S, Ishihara R, Ueda Y, Kanno T, Uchida I (2011) Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction *primers*. *Arch Virol.*, 156: 1281–1285.

Hatama S, Nobumoto K, Kanno T (2008) Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV9 and BPV10. *The Journal of general virology*, v. 89, p. 158-163.

Hedge RS (2002) The papillomavirus E2 proteins: structure, function and biology. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. V. 31, p. 343 – 360.

Hirigoyen D, Giovanelli HB, Azambuja C, Stoll M (1992). Amplificación de AND in vitro (PCR): II. desarrollo y aplicaciones en el area veterinaria. *Veterinária* 28: 14 – 22.

Iglesias AP, Brito LAB (2004) Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos. *Ciência Animal Brasileira* v. 5, n. 1, p. 39-45.

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

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, *et al.* (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27:95–125.

Lancaster WD & Olson C (1982) Animal papillomaviruses. *Microbiol. Res.* 46 (2):191-207.

Lancaster WD (1981) Apparent lack of integration of bovine papillomavirus DNA in virus-induced equine and bovine tumor cells and virustransformed mouse cells. *Virology* 108, 251–255.

Lancellotti CLP, Levi JE, Silva MALG, Schwarzschild M, Nicolau SM (2000). Diagnóstico Laboratorial. In: CARVALHO, J.J.M.; OYKAWA, N. I Consenso Brasileiro de HPV. 1. ed. São Paulo, BG Cultural, p.45 – 60.

Leal AM, Ferraz OP, Carvalho C, Freitas AC, Beniston RG, Beçak W, Campo MS, Stocco dos Santos RC (2003) Quercetin induces structural cromossomes aberrations and uncommon rearragements in bovine cells transformed by E& protein of bovine papillomavirus type 4. *Vet Comp. Oncol* 1:15-21.

Leishangthem GD, Somvanshi R, Tiwari AK (2008) Detection of bovine papillomaviruses in cutaneous warts/ papillomas in cattle. *Indian J. Vet. Pathol.*, 32: 15-20.

Lindsey CL, Almeida ME, Vicari CF, Carvalho C, Yagui A, Freitas AC, Beçak W, Stocco dos Santos RC (2009) Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genet. Mol. Res.*, 8: 310-318.

Literak I, Tomita Y, Ogawa T, Shirasawa H, Smid B, Novotny L, Adamec M (2006) Papilomatosis in a european bison. *Journal of Wildlife Disease*, v. 42, p. 149-153.

Longworth MS and Laimins LA (2004) The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* 78:3533-3541.

Lowy DR, Kirnbauer R, Schiller JT (1994) *Genital human papillomavirus infection*. Proceedings of the National Academy of Science of United States of America. V. 91, p. 2436 – 2440.

Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002) Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*, 30:1292–305.

Maeda Y, Shibahara T, Wada T, Kadota K, Kanno T, Uchida I and Hatama S (2007) An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papillomavirus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. *Vet Microbiol* 121: 242 – 248.

Manos MM, Ting Y, Wright D K, Lewis A J, Broker T R & Wolinsky S M (1989) The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cell* 7: 209–214.

McBride, A. A., J. C. Byrne, and P. M. Howley (1991) The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 266:18411–18414.

Melo CB and Leite RC. Papilomatose Bovina. *Ciênc. Vet. Tróp.* 6(1): 1-12, 2003.

Modis Y, Trus BL, Harrison SC (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal* 21 (18): 4754-4762.

Munday JS and Knight CG (2010) Amplification of feline sarcoid-associated papillomavirus DNA sequences from bovine skin. *Vet. Dermatol.* 21, 341–344.

Munday JS, Knight CG, Howe L (2010) The same papillomavirus is present in feline sarcoids from North America and New Zealand but not in any non-sarcoid feline samples. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22, 97–100.

Nasir L, Campo MS (2008) Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Vet. Dermatol.*, 19(5): 243-254.

Nasir L, McFarlane ST, Torrontegui BO & Reid SWJ (1997) Screening for bovine papillomavirus in peripheral blood cells of donkeys with and without sarcoids. *Res Vet Sci* 63, 289–290.

Nasir L, Yuan Z, Philbey AW, Gault EA, Campo MS (2007) Detection of bovine papillomavirus type 1 genomes and viral gene expression in equine inflammatory skin conditions. *Virus Research* 124, 245–249.

Ogawa T, Tomita Y, Okada M and Shirasawa H (2007) Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J Gen Virol* 88:1934-1938.

Ogawa T, Tomita Y, Okada M, Shinozaki K, Kubonoya H, Kaiho I and Shirasawa H (2004) Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virol* 85:2191-2197.

Otten N, Von Tscherner C, Lazary S, Antczark DF, Gerber H (1993) DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing. *Arch Virology* 132: 121 – 131.

Pangty K, Singh S, Goswami R, Saikumar G, Somvanshi R (2010) Detection of BPV-1 and -2 and quantification of BPV-1 by real-time PCR in cutaneous warts in cattle and buffaloes. *Transbound Emerg. Dis.*, 57: 185-196.

Read SJ, Mitchell JL, and Fink CG (2001) LightCycler multiplex PCR for the laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 3056-3059.

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997) Product differentiation by analysis of DNA *melting* curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*; 245:154–60.

Roperto S, Comazzi S, Ciusani E, Paolini F, Borzacchiello G, Esposito I, Luca R, Russo V, Urraro C, Venuti A, Roperto F (2011) Peripheral blood mononuclear cells are additional sites of productive infection of bovine papillomavirus type 2. *J. Gen. Virol.* vir.0.031740-0.

Rose RC, Bonneze W, Da Rin C, McCance DJ, Reichman RC (1994) Serological differentiation of human papillomavirus types 11, 16 and 18 using recombinant virus-like particles. *J Gen Virol*;75:2445– 9.

Schmitt M, Fiedler V, Müller M (2010) Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPV genotyping assay. *J Virol Methods.* Dec;170(1-2):67-72. Epub 2010 Sep 15.

Schuch LFD (1998) Papilomatose bovina. In: RIETCORREA, F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.D.C. *Doenças de ruminantes e eqüinos*. Pelotas: Ed. Universitária/ UFPel., p.115-118.

Schulman FY, Krafft AE, Janczewski T (2001) Feline cutaneous fibropapillomas: clinicopathologic findings and association with papillomavirus infection. *Vet. Pathol.* 38, 291–296.

Seo SH, Wang L, Smith R and Collisson EW (1997) *The carboxyl-terminal 120 residue polypeptide of IB virus nucleocapsid induces CTLs and protects chickens from acute infection.* *Journal of Virology*, 71, 7889–7894.

Silva DW, Nobre M, Gonzaga RS, Viana LS, Ramalho Neto E (2005). High Quality DNA from Human Papillomavirus (HPV) for PCR/RFLPs. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 48: 37-40.

Silva MAR (2010). Avaliação da influência do Papilomavírus bovino sobre espermatozoides e desenvolvimento embrionário em bovinos (*Bos taurus*). Qualificação de tese doutorado apresentado ao programa de pós-graduação em genética pela UFPE.

Silva MAR, Carvalho CCR, Coutinho LCA, Reis MC, de Aragão Batista MV, de Castro RS, dos Anjos FBR, de Freitas AC (2012) . Co-infection of Bovine

Papillomavirus and Feline-Associated Papillomavirus in bovine cutaneous warts. *TRANSBOUND EMERG DIS*, v. JAN, p. no-no.

Silva MAR, Pontes NE, Da Silva KMG, Guerra, MMP, Freitas AC, (2011) Detection of bovine papillomavirus type 2 DNA in commercial frozen semen of bulls (*Bos taurus*). *Animal Reproduction Science (Print)*, v. 9, p. 9-9.

Silvestre O, Borzacchiello G, Nava D, Iovane G, Russo V, Vecchio F, Ausilio D, Gault EA, Campo MS and Paciello O (2009) Bovine papillomavirus type 1 DNA expression in water buffalo fibropapillomas. *Vet. Pathol.* 46, 636–641.

Singh V, Somvanshi, R, Tiwari, AK (2009). Papillomatosis in Indian cattle: occurrence and etiopathology. *Indian J. Vet. Pathol.*, 33: 52-57.

Somvanshi R (2011) Papillomatosis in Buffaloes: A Less-Known Disease. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1865-1682.

Somvanshi R, Pangty K, Singh S, Goswami R, Saikumar G (2010) Detection of BPV-1 and -2 and quantification of BPV-1 by real-time PCR in cutaneous warts in cattle and buffaloes. *Transbound Emerg.Dis.*, 57: 185–196.

Somvanshi R, Pathania S, Dhama K, Saikumar G, Shahi S (2011) 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 Cow. *Transboundary and Emerging Diseases*.

Souza HM (2007) Expressão do gene L1 do Papilomavírus bovino tipo 4 em células da levedura *Pichia pastoris*. Dissertação de mestrado, 74p, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pe.

Stanek C, Brandt S, Haralambus R, Schoster A, Kirnbauer R (2008) Peripheral blood mononuclear cells represent a reservoir of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected equines. *Journal of General Virology* 89, 1390–1395.

Stocco dos Santos RC, Lindsey CJ, Ferraz O, Pinto JR, Mirandola RS, Benesi FJ, Birgel EH, Bragança Pereira CA and Beçak W (1998) Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: a experimental model. *J Gen Virol* 79: 2127-2135.

Stringfellow DA *et al.* (1988) *Virology*. Michigan: Upjohn, 139p.

Teifke JP, Kidney BA, Lohr CV, Yager JA (2003) Detection of papillomavirus-DNA in mesenchymal tumour cells and not in the hyperplastic epithelium of feline sarcoids. *Vet. Dermatol.* 14, 47–56.

Tornesello ML, Duraturo ML, Wadell KM, Biriawaho B, Downing R, Balinandi S, Lucas SB, Buonaguro L, Buonaguro FM (2006) Evaluating the role of human papillomaviruses in conjunctival neoplasia. *British Journal of Cancer* 94: 446 – 449.

Ulrich RL, Ulrich MP, Norwood DA, Christensen DR (2006) Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 551–559.

Van Den Berg RJ, Vaessen N, Endtz HP, Schulín T, van der Vorm ER, Kuijper EJ (2007) Evaluation of realtime PCR and conventional diagnostic methods for the detection of *Clostridium difficile* associated diarrhoea in a prospective multicentre study. *J Med Microbiol* 56:36–42.

Van Dyk E, Bosman A-M, vanWilpe E, Williams JH, Bengis RG, vanHeerden J, Venter EH (2011). Detection and characterisation of papillomavirus in skin lesions of giraffe and sable antelope in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 82(2): 80-85.

Van Dyk E, Oosthuisen MC, Bosman A-M, Nel P J, Zimmerman D, Venter E H (2009) Detection of bovine papillomavirus DNA in sarcoid affected and healthy free-roaming zebra (*Equus zebra*) populations in South Africa. *Journal of Virological Methods* 158: 141–151.

Van Regenmortel MHV *et al.* (2000) *Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses*. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses . San Diego: Academic Press.

Varella RB, Pires IL, Saraiva CA, Guimarães ACC, Guimarães MAAM (2005) Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus herpes simples (HSV) em pacientes transplantados e não-transplantados. *J Bras Patol Med Lab* 41 :257-62.

Wagner M, Schoder D, Schmalwieser A, Schauburger G, Hoorfar J, Kuhn M (2005) Novel approach for assessing performance of PCR cyclers used for diagnostic testing. *J. Clin. Microbiol* 6; 2724-2728.

Wentink GH, Frankena K, Bosch JC, Vandehoek JED Van den Berg T (2000) Prevention of disease transmission by semen in cattle. *Livestock Production Science* 60: 207 – 220.

William JB, Kiruakaran JJ, Uthuman KM *et al.* (1992) *Survey on incidence and complications of bovine cutaneous papillomatosis*. *Indian Veterinary Journal* 69:842-844.

Wittwer CT, Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55:4 611–622.

Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN, Elenitoba-Johnson KS (2001). Real-time multiplex PCR assays. *Methods*;25:430–42.

Wosiacki SR, Barreiro MAB, Alfieri AF and Alfieri AA (2005) Semi-nested PCR for detection of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *J Virological Methods* 126: 215 – 219.

Yagui A, Carvalho C, Freitas AC, Góes LGB, Dagli MLZ, Birgel Jr EH, Stocco dos Santos RC (2006). Papillomatosis in cattle: In situ detection of bovine papillomavirus DNA sequences in reproductive tissues. *Braz J morphol Sci* 23: 525 – 529.

Yagui A, Dagli MLZ, Birgel Jr EH, Alves Reis BCAA, Ferraz OP, Goes LGB, Pituco EM, Freitas AC, Becak W, Stocco dos Santos RC (2008) Simultaneous presence of bovine papillomavirus (BPV) and bovine leukemia virus (BLV) in different bovine tissues: in situ hybridization and cytogenetic analysis. *Gen. Mol. Res.*, 7: 487-497.

Yang L, Li R, Mohr IJ, Clark R e Botchan MR (1991) *Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2*. *Nature* 353(6345): 628-32.

Zhu W, Dong J, Shimizu E, Hatama S, Kadota K, Goto Y, Haga T (2011) Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. *Arch. Virol.* 157, 85–91.

Zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1288 (2), F55–F78.

Zur Hausen H (1999) Viruses in human cancers. *Eur. J. Cancer* 35, 1174–1181.

Zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-350.

9. Curriculum vitae (Lattes)

Breno Moacir Farias de Albuquerque

Curriculum Vitae

Dados Pessoais

Nome Breno Moacir Farias de Albuquerque
Filiação Moacir Borges de Albuquerque Filho e Weidma Maria Farias Albuquerque
Nascimento 19/02/1987 - Recife/PE - Brasil
Carteira de Identidade 6076120 SDSPE - PE - 11/11/2003
CPF 06749877486

Formação Acadêmica/Titulação

2005 - 2008 Graduação em Farmácia.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Novos compostos e halogenados da série 5-benzilideno-3-(2,6-dicloro-benzil)-imidazolidina-2,4-ona: síntese e comprovação estrutural.
Orientador: Ivan da Rocha Pitta
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

2007 - 2007 Curso de curta duração em Drug Design Today.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2010 - Atual Vínculo: Mestrado no PPGG-UFPE , Enquadramento funcional: ALUNO-MESTRADO , Carga horária: 30, Regime: Parcial

Atividades

02/2010 - Atual Projetos de pesquisa, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética
Participação em projetos:
Estudo da aplicação da metodologia ELINOR para a detecção e tipificação de Papilomavirus Bovino em amostras biológicas

10/2006 - 10/2008 Projetos de pesquisa, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Antibióticos
Participação em projetos:
EDITAL MCT / FINEP / CT-INFRA - PROINFRA - 01/2005: Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica: Consolidação de um Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Fármacos e Medicamentos em Pernambuco - NUPIT-UFPE (<http://www.ufpe.br/gpit>)

Projetos

2010 - 2012 Estudo da aplicação da metodologia ELINOR para a detecção e tipificação de Papilomavirus Bovino em amostras biológicas

Descrição: O projeto visa a produção de uma estratégia diagnóstica para papilomatose bovina, fazendo uso da Rede ELINOR que se caracteriza pela Luminescência Exacerbada de Nanocompósitos Metal/(polímero condutor) em marcadores biológicos.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Integrantes: Breno Moacir Farias de Albuquerque (Responsável); ; ANTONIO CARLOS DE FREITAS

Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES

2006 - 2008 EDITAL MCT / FINEP / CT-INFRA - PROINFRA - 01/2005: Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica: Consolidação de um Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Fármacos e Medicamentos em Pernambuco - NUPIT-UFPE (<http://www.ufpe.br/gpit>)

Descrição: Núcleo de pesquisa em inovação terapêutica: consolidação de um centro de pesquisa, desenvolvimento e inovação em fármacos e medicamentos em Pernambuco. Órgão Financiador: MCT / FINEP / CT-INFRA - PROINFRA - 01/2005 Processo: 1101/06 Proponente: FADE-UFPE/UFPE/UFPE-PDI Período: 24 meses 10/2006 a 09/2008 Coordenador do subprojeto: Ivan da Rocha Pitta Valor: R\$ 1.330.492,00 A organização da pesquisa no projeto NUPIT-UFPE, alicerçada nos PROGRAMAS PRIORITÁRIOS e articulada com os programas de pós-graduação da UFPE, busca um maior relacionamento entre a pesquisa científica e tecnológica e o interesse público e privado. Espera-se, como parceiros e usuários potenciais dos conhecimentos gerados no NUPIT-UFPE tanto o setor público (laboratórios farmacêuticos estatais) como o setor privado (indústria farmacêutica nacional)..

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (5); Mestrado acadêmico (2); Doutorado (2);

Integrantes: Breno Moacir Farias de Albuquerque; Maria do Carmo Alves de Lima; Terezinha Gonçalves da Silva; Suely Lins Galdino; Ivan da Rocha Pitta (Responsável); Ricardo Olímpio de Moura; Marina Galdino da Rocha Pitta

Financiador(es): Financiadora de Estudos e Projetos-FINEP

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. FREITAS, A. C., SILVA, M. A. R., JESUS, A. L. S., MARIZ, F. C., CORDEIRO, M. N., DE ALBUQUERQUE, B. M. F., BATISTA, M. V. A. Recent insights into Bovine Papillomavirus. AFR J MICROBIOL RES. v.5, p.6004 - 6012, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. DE ALBUQUERQUE, B. M. F., CRUZ, H. L. A., COIMBRA, E. C., AMARAL, C. M. M., BATISTA, M. V. A., SILVA, M. A. R., JESUS, A. L. S., BALBINO, V. Q., FREITAS, A. C. DEVELOPMENT OF A REAL TIME PCR TYPIFICATION/QUANTIFICATION ASSAY FOR BOVINE PAPILOMAVIRUS In: XXII National Meeting of Virology & VI Mercosur Meeting of Virology, 2011, Atibaia. **Annals of XXII National Meeting of Virology & VI Mercosur Meeting of Virology**. Belo Horizonte - MG, Brazil: Veterinary Virology, 2011. v.16. p.263 - 284