

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética

Morse Edson Pessoa Júnior

**Identificação dos tipos de papilomavírus bovino em tecido
sanguíneo e em lesões cutâneas de bovinos afetados por
papilomatose**

Recife
2016

Morse Edson Pessoa Júnior

**Identificação dos tipos de papilomavírus bovino em
tecido sanguíneo e em lesões cutâneas de bovinos
afetados por papilomatose**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas

**Recife
2016**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Pessoa Júnior, Morse Edson

Identificação dos tipos de papilomavírus bovino em tecido sanguíneo e em lesões cutâneas de bovinos afetados por papilomatose / Morse Edson Pessoa Júnior. – Recife: O Autor, 2016.

146 f.: il.

Orientador: Antônio Carlos de Freitas

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Pós-graduação em Genética, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Papilomavírus 2. Bovino I. Freitas, Antônio Carlos de (orient.) II. Título.

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-348

Morse Edson Pessoa Júnior

**Identificação dos tipos de papilomavírus bovino em
tecido sanguíneo e em lesões cutâneas de bovinos
afetados por papilomatose**

Aprovado em 18/08/2016

Banca Examinadora:

**Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dra. Clara Nilce Barbosa
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Dra. Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dra. Heidi Lacerda
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Jacinto da Costa Silva Neto
Universidade Federal de Pernambuco**

Recife

2016

***Aos meus amados pais, Edson e Marly,
pelo apoio, amor e incentivo, sem os
quais eu não conseguiria. Dedico.***

Agradecimentos

A Deus que me protegeu, deu forças nos momentos difíceis e vontade de vencer;

Aos meus amados pais, minha irmã Flávia, e a todos os meus familiares pela força, incentivo e constante estímulo;

Ao meu orientador Professor Antonio Carlos de Freitas por todos os ensinamentos, paciência e pela oportunidade;

A Capes/REUNI pelo importante apoio financeiro ao longo do curso;

À Coordenação do Programa de Pós – Graduação em Genética (UFPE), em especial aos Professores Neide Santos e Marcos André, pelo eficiente trabalho e a todos os docentes do programa;

Ao IPA pelo fornecimento das amostras, e em especial aos pesquisadores, Dr. Fernando Tenório e a Dra. Patricia Carrazzoni;

A todos os colegas do LEMTE, em especial: André, Angélica, Pavla, Nayara, Elias, Milena, Marcos, Carol, Bianca, Marcondes, Elyda, Rita, Marcelo, Camila, Humberto, Luciana, Ana Paula, Ana Jessica, Rodrigo, Karin, Jackeline, Barbára, Talita; Dafane;

A todos os Colegas do LED, em especial: Tyago, Adiles, Terto, Manassés, Jessica, Dijanar, Evilis, Diego, Rafaela, Nicole, Augusto obrigado a todos pelos bons momentos ao longo dessa jornada;

A todos os colegas do LABBE, em especial: Lidiane, Marcos, Carlos, Bruno, Heidi, Sergio, Plinio, obrigado a todos pelos bons momentos vividos;

A minha amada esposa Izabella Castro agradeço pelo incentivo, por sempre acreditar em mim, pela paciência nos momentos de ausência e por estar sempre ao meu lado, me apoiando;

Aos Professores José Ferreira e Tania Rieger por abrirem as portas do seu laboratório, e por todos os ensinamentos, obrigado;

A Dra. Marinalda Vilela, por seus ensinamentos, incentivos e por ser um exemplo a ser seguido, obrigado;

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram com esse trabalho, mais não estão citados, meus sinceros agradecimentos.

“Levamos uma vida que não nos leva a nada, levamos muito tempo para descobrir...”

Humberto Gessinger

Resumo

A papilomatose bovina é uma doença infecto-contagiosa causada pelo Papillomavírus Bovino (BPV). Existem relatos na literatura de bovinos infectados com mais de um tipo de BPV, além de animais que não apresentam os sintomas da doença. O estudo tem como objetivos, genotipar os animais quanto à infecção pelo BPV e ao desenvolvimento da papilomatose cutânea; analisar a presença de co-infecções em lesões cutâneas e em tecido sanguíneo, avaliar a associação de polimorfismos dos genes *MBL2* e *TNF-alfa* com a papilomatose bovina. Foram coletadas 127 amostras de sangue de bovinos e 35 amostras de lesões cutâneas, realizada a tipificação dos BPVs por PCR e o estudo de associação dos SNPs dos genes *TNF-alfa* e *MBL2*, por PCR e sequenciamento. Os tipos de BPV mais encontrados nas amostras de sangue foram: BPV 10 (97,75%), BPV 12 (92,13%), BPV 2 e BPV 9 com (88,76%). Os tipos de BPV mais encontrados nas lesões foram: BPV 2 e BPV 3 (100%), BPV 11 (97,1%), BPV 10 (94,2%), BPV 12 (91,42%), BPV 4 (82,85%), BPV 6 (80,0 %). A co-infecção foi detectada em 99% das amostras de sangue. Nas amostras de lesões foi constatado a co-infecção em 100% das amostras. As sequências obtidas para o gene *MBL2* apresentaram 245 sítios conservados e 02 variáveis, o gene *TNF-alfa* apresentou 638 sítios conservados e um variável. Nas amostras avaliadas, não foram encontradas associações com os SNPs dos genes *MBL2* (exon1) com um p-value de 0.837, *TNF-alfa* (-1044 a -406) com um p-value de 0.782 e a papilomatose bovina.

Palavras-chave: Polimorfismo. Bovinos. Papilomavírus. *MBL2*. *TNF-alfa*.

Abstract

Bovine papillomatosis is an infectious disease caused by Bovine Papillomavirus (BPV). There are reports in the literature of infected cattle with more than one type of BPV, and animals that do not show symptoms of the disease. The study aims, genotyping animals as the BPV infection and the development of cutaneous papillomatosis; analyze the presence of co-infections in skin lesions and blood tissue, evaluate the association of polymorphisms of genes *MBL2* and *TNF-alpha* with bovine papillomatosis. 127 were collected bovine blood samples and 35 samples of skin lesions, carried out the characterization of BPVs PCR and SNP association study of *TNF-alpha* and *MBL2* by PCR and sequencing. The BPV types most commonly found in blood samples were BPV 10 (97.75%), BPV 12 (92.13%), BPV 2 and 9 with BPV (88.76%). The BPV types most commonly found in lesions were BPV BPV 2 and 3 (100%), BPV 11 (97.1%), BPV 10 (94.2%), BPV 12 (91.42%), BPV 4 (82, 85%), BPV 6 (80.0%). Co-infection was detected in 99% of the blood samples. In lesions of the samples was found to co-infection in 100% of the samples. The sequences obtained for the *MBL2* gene are conserved sites 245 and 02 variables, *TNF-alpha* gene showed 638 and a variable conserved sites. In the analyzed samples, associations were found with the SNPs of the *MBL2* (exon1) with a p-value of 0.837, *TNF-alpha* (-1044 to -406) with a p-value of 0.782 and bovine papillomatosis.

Key words: Polymorphism. Cattle. Papillomavirus. *MBL2*. *TNF-alpha*.

Lista de Ilustrações

	Página
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.....	21
Figura 2: Estágios do ciclo viral do papilomavírus em epitélio estratificado escamoso.....	23
Figura 3: Animais infectados por papilomavírus bovino (BPV). A. Fibropapilomas na cabeça e pescoço causados por BPV2. B. Papiloma epiteliais em tetas causados por BPV6. C. Fibropapilomas no pênis causados por BPV1	25
Figura 4: Representação esquemática de papilomatose bovina em diferentes localizações no bovino.....	25
Figura 5: Carcinomas induzidos por BPV. A Câncer de Bexiga; B Progressão de papiloma a câncer do trato gastro-intestinal superior.....	27
Figura 6: Distribuição da papilomatose bovina no mundo.....	30
Figura 7: SNP na região promotora do gene TNF-alfa (- 0104 a – 406) associado à Leucemia Viral Bovina (BLV).....	36
Figura 8: Fluxograma representando a metodologia desse estudo.....	48
Figura 9: Gráfico representativo da localização dos sítios de infecção das lesões cutâneas em bovinos.....	49
Figura 10: Gel representativo PCR/ β -globina bovina com amplicons de 450 pb.....	50
Figura 11: Detecção dos BPVs em sangue periférico de bovinos. A- Eletroforeses de PCRs específicas para os tipos de BPV (-1,-2,-3,-4,-6,-9,-10,-11 e -12), Linhas 1 – 3 amostras positivas, linha 4 marcador de massa molecular 100 pares de bases. B- Distribuição dos tipos de BPVs detectados por PCR específica em sangue bovino.....	51
Figura 12: Gráfico representativo do percentual de BPV por agrupamento filogenético em amostras de sangue bovino.....	52
Figura 13: Distribuição dos tipos de BPVs detectados por PCR específica em lesões cutâneas em tecido bovino.....	53
Figura 14: Gráfico representativo do percentual de BPV, por agrupamento filogenético, em amostras de lesões cutâneas.....	54

Figura 15: Gráfico representativo da quantidade de BPV por amostras em sangue bovino, variando de apenas um tipo por amostra a oito tipos por amostra.....	55
Figura 16: Gráfico representativo da quantidade de BPV por amostras em amostras de lesão cutânea em tecido bovino, variando de cinco tipos por amostra a nove tipos por amostra.....	56
Figura 17: Gel representativo PCR – <i>MBL2</i> (Exon 1), com fragmentos de 247 pb.....	57
Figura 18: Gel representativo PCR – <i>TNF-alfa</i> , do fragmento de 639 pb contendo a região promotora do gene (-1044 a -406).....	59

Lista de Quadros

Quadro 1: Proteínas expressas pelos Papilomavírus, localização e funções.....	Página 22
Quadro 2: Análise realizada com o programa SNPstats contendo os SNPs, frequência, P-value e OR, para o exon 1 do gene <i>MBL2</i>	58
Quadro 3: Análise realizada com o programa SNPstats contendo os SNPs, frequência, P-value e OR, para a região promotora do gene <i>TNF-alfa</i>	59

Lista de Tabelas

Tabela 1: Relação de amostras de sangue bovino, com a numeração do LEMTE, tipos de BPV, quantidade de BPVs por amostra, presença ou ausência de lesões (grupo 1= com lesão, grupo 2= sem lesão) e o agrupamento filogenético.....	Página 80
Tabela 2: Relação de amostras de lesão cutânea, com a numeração do LEMTE, tipos de BPV, quantidade de BPVs por amostra, e o agrupamento filogenético.....	85

Lista de Abreviaturas

μL - Microlitros

BLV – Leucemia bovina viral

BPV – Papilomavírus bovino

DCR – Carboidratos cálcio-dependentes

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ECR – Região de controle precoce

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EEI - Estação Experimental de Itambé

HPV – Papilomavírus humano

HSIL – Lesões de alto grau

ICTV – comitê internacional sobre taxonomia de vírus

IPA - Instituto Agronômico de Pernambuco

Kb – Quilobase

kDa - Quilodalton

LCR – Região de controle tardio

LSIL – Lesões de baixo grau

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MBL – Lectina Ligadora de Manose

NCR – Região não codificante

ng – Nanograma

NIC - Neoplasia intraepitelial cervical

Nm – Nanômetro

ORF – Quadro aberto de leitura

Pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PV – Papilomavírus

RNA – Ácido Ribonucléico

SNPs – Polimorfismos de base única

TAE – Tris acetato – EDTA

TNF – Fator de necrose tumoral

Sumário

1. Introdução.....	17
2. Revisão da Literatura.....	19
2.1 Papilomavírus.....	19
2.2 Infecção papilomatose bovina.....	23
2.3 Importância econômica.....	28
2.4 Epidemiologia, diagnóstico e tratamento da papilomatose bovina.....	30
2.5 Fator de Necrose Tumoral (TNF-alfa).....	33
2.6 Lectina Ligante de Manose (MBL).....	36
3. Objetivos.....	42
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4. Material e Métodos.....	43
4.1 Descrição da área estudada.....	43
4.2 Obtenção das amostras.....	43
4.3 Coleta do material.....	44
4.4 Genotipagem.....	45
4.4.1 PCR Beta-Globina bovina.....	45
4.4.2 Detecção de Papilomavírus Bovino (BPV) em tecido sanguíneo.....	45
4.4.3 Genotipagem amostras de lesão cutânea.....	45
4.4.4 Genotipagem para o gene <i>MBL2</i>	46
4.4.5 Genotipagem para o gene <i>TNF-alfa</i>	46
4.5 Sequenciamento e análise dos dados.....	46
4.6 Análise estatística.....	47
5. Resultados.....	49

5.1 Genotipagem.....	49
5.1.1 PCR Beta-Globina bovina.....	49
5.1.2 Detecção de Papilomavírus Bovino (BPV) em tecido sanguíneo.....	50
5.1.3 Genotipagem amostras de lesão cutânea.....	52
5.2 Co-infecção entre os diversos tipos de BPVs.....	54
5.2.1 Co-infecção de BPVs em amostras de tecido sanguíneo.....	54
5.2.2 Co-infecção de BPVs em amostras de lesão cutânea.....	55
5.3 Genotipagem para o gene <i>MBL2</i>	56
5.4 Genotipagem para o gene <i>TNF-alfa</i>	58
6. Discussão.....	61
7. Conclusões.....	68
8. Referências Bibliográficas.....	69
9. Anexos.....	80
9.1 Artigo I – Análise da presença de co-infecções em bovinos infectados por papilomatose bovina e identificação de novos tipos circulantes em uma fazenda do estado de Pernambuco, Brasil.....	89
9.2 Artigo II – Estudo de associação dos SNPs do gene <i>MBL2</i> com a susceptibilidade à papilomatose bovina, em bovinos da região Nordeste do Brasil.....	105
9.3 Instruções aos autores – Revista <i>Transboundary and Emerging Diseases</i>	119
10. Curriculum vitae (Lattes).....	138

1. Introdução

A papilomatose bovina é uma doença infecto-contagiosa causada pelo Papillomavírus Bovino (BPV) que compromete a produtividade do rebanho. É importante economicamente porque leva à redução da produção do leite, ao baixo ganho de peso e deterioração da aparência e do couro animal, provocando uma redução em até 80% do valor de revenda.

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo com cerca de 200 milhões de cabeças, alguns fatores como as doenças infecto-contagiosas ameaçam a produtividade nacional, dentre estas, a papilomatose. Na região Nordeste, em especial no Estado de Pernambuco, região da Zona da Mata, a ocorrência de papilomatose bovina pode chegar a 30% de animais acometidos, provocando grandes perdas econômicas para os criadores.

Existem relatos na literatura de bovinos infectados com mais de um tipo de BPV, além de animais que não apresentam os sintomas da doença, indicando que o BPV é necessário, mas não suficiente para o desenvolvimento das lesões. Dentre os fatores que podem estar relacionados com esta situação está a capacidade de montar uma resposta imune eficiente.

Polimorfismos de Base Única (SNPs) em genes responsáveis pela imunidade inata tem sido objeto de estudo de várias pesquisas e apresentam grande importância na susceptibilidade dos animais às infecções e ao desenvolvimento das lesões.

Várias proteínas estão envolvidas na resposta imunológica, dentre elas o Fator de Necrose Tumoral (TNF-alfa) e a Lectina Ligadora de Manose (MBL).

Essas proteínas estão relacionadas com a defesa inicial contra microrganismos.

O TNF-alfa presente nos macrófagos é liberado por inúmeros estímulos e tem importância central nas dinâmicas virais, por ser um fator de proteção contra progressão das infecções. Em estudos com HPV, a ocorrência de polimorfismos no gene *TNF-alfa* está relacionada com a presença de lesões de baixo ou alto grau dependendo da alteração presente no genótipo.

A ocorrência de mutações na região promotora ou nas regiões codificantes do gene *MBL* resultam na diminuição de expressão, causando a incapacidade de manter a sua conformação oligomérica necessária para fixar a manose e ativar o complemento, comprometendo as defesas do organismo nas infecções bacterianas e virais.

Em relação à infecção por BPV, não há dados na literatura associados aos polimorfismos dos genes *TNF-alfa* e *MBL2*. Nosso estudo é pioneiro sobre a associação de SNPs dos genes *TNF-alfa* e *MBL2* e pode ajudar a esclarecer a relação das múltiplas infecções em bovinos, bem como a presença de animais infectados que apresentam diferentes níveis de comprometimento, contribuindo com o controle e a prevenção da papilomatose bovina.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os bovinos quanto à infecção por BPV e analisar a presença de co-infecções, em tecido sanguíneo e lesões cutâneas. Realizar um estudo de associação entre os polimorfismos na região promotora do gene *TNF-alfa* e do exon 1 do gene *MBL2* e a papilomatose bovina.

2. Revisão da literatura

2.1 Papilomavírus

Os papilomavírus (PV) formam um grupo com uma diversidade grande de vírus que infectam os amniotas (Freitas *et al.*, 2011). No entanto são espécie-específicos e até mesmo em condições experimentais, não infectam outro hospedeiro que não o seu natural (Campo, 2006). Os poucos casos conhecidos de infecção cruzada entre PV envolvem o papilomavírus bovino (BPV) e outras espécies animais (Freitas *et al.*, 2011).

Os papilomavírus eram classificados na subfamília Papilomavirinae, dentro da família Papovaviridae que incluíam os Polyomavírus (Bernard, 2005). Posteriormente, os PV foram reclassificados e formam a grande família Papilomaviridae, que compreende 29 gêneros (Alphapapillomavirus a Dyoiotapapillomavirus) e mais de 200 tipos virais (de Villiers *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2010). Embora a maior parte dos tipos virais caracterizados correspondam a PV humanos (150), 64 tipos virais foram identificados em hospedeiros mamíferos não humanos, três tipos foram isolados de pássaros e outros dois de répteis (Bernard *et al.*, 2010).

A presença de lesões verrucosas em animais foi descrita no século IX, em equinos (Lancaster, 1982) e em canídeos (Nicholls, 2000). Todavia, apenas em 1933 que o vírus foi isolado a partir de lesões de coelhos (Shope, Hurst, 1933; Leto *et al.*, 2011). Em 1935, Rous demonstrou que o PV apresentava uma ação oncogênica (Crawford, 1963). No entanto, a estrutura genômica do PV só foi descrita em 1963 (Crawford, 1963). Os estudos do PV começaram a evoluir a partir de 1970, após Zur Hausen ter mostrado a participação do

papilomavírus humano (HPV) na etiogênese do câncer cervical (Zur Hausen, 1999; Leto *et al.*, 2011).

A papilomatose bovina é causada pelo *Papillomavirus Bovino* (BPV). Os BPVs são vírus oncogênicos, não envelopados, com morfologia icosaédrica e diâmetro de 52-55 nm. O capsídeo apresenta 72 capsômeros (60 hexaméricos e 12 pentaméricos) e o ácido nucléico é composto por DNA de fita dupla circular com massa molecular de $5,0 \times 10^6$ daltons e cerca de 8 kb (Stringfellow *et al.*, 1988).

O genoma do BPV contém segmentos cada um constituído por uma série de regiões ou ORFs que codificam as proteínas virais. A região de controle precoce (ECR – Early Control Region), tardio (LCR – Long Control Region) e a região não codificante (NCR – NonCoding Region), separadas por dois sítios de poliadenilação (Zheng Baker, 2006; Borzachiello, 2007; Leto *et al.*, 2011), sendo que apenas uma das fitas de DNA atua como molde para a transcrição (Fernandes *et al.*, 2013).

O segmento E ocupa 50% do genoma viral, possuindo aproximadamente 4.000 pb e codifica as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7. A região L ocupa 40% do genoma, com aproximadamente 3.000 pb e contém os genes *L1* e *L2*, que codificam proteínas do capsídeo. A região não codificante que ocupa 10% do genoma, com aproximadamente 1.000 pb, contém a origem da replicação e os sítios de ligação de múltiplos fatores de transcrição, que são importantes na regulação da RNA polimerase II (Campo *et al.*, 1994; Wosiacki *et al.*, 2002; Zheng, Baker, 2006; Borzachiello, 2007; Claus *et al.*, 2007; Freitas *et al.*, 2011; Leto *et al.*, 2011; Rampias *et al.*, 2013; Bocaneti *et al.*, 2014) (figura 1).

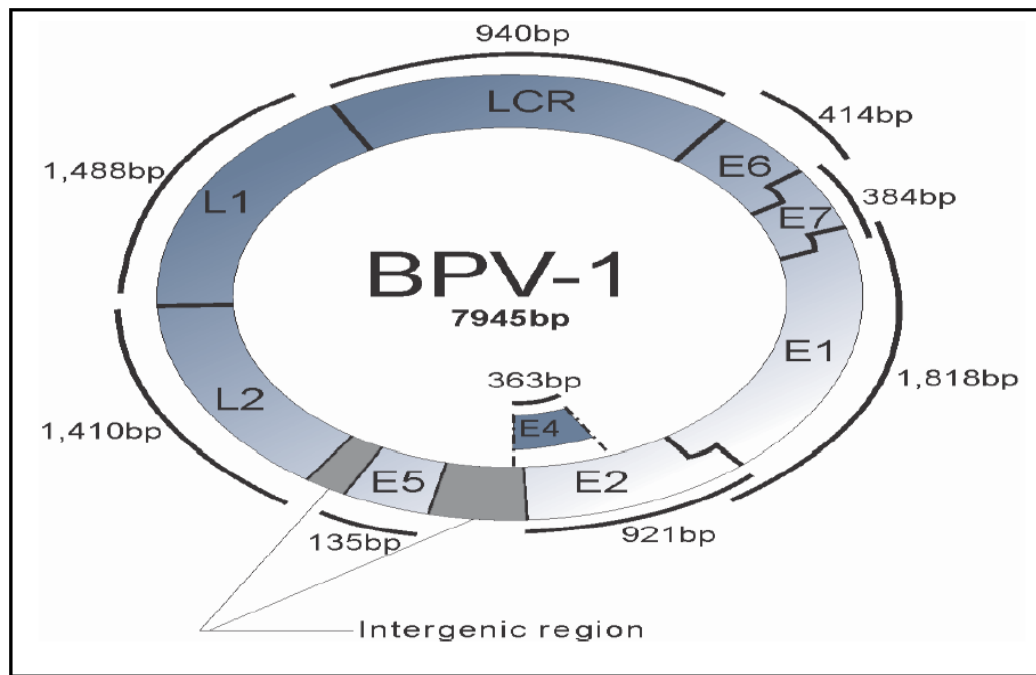


Figura 1: Diagrama da organização do genoma de BPV1. O genoma viral está representado em círculo, demonstrando as posições dos genes virais E6, E7, E1, E2, E4, E5, L2, L1 e o LCR entre os genes L1 e E6 (Freitas *et al.*, 2011).

O gene *E1* está associado com a replicação viral, e o *E2* com a transcrição e replicação do vírus. O gene *E4* atua no controle da maturação e alteração da matriz intracelular. Os genes *E5*, *E6* e *E7* estão envolvidos na transformação celular. A região “Late” é formada pelos genes que codificam as proteínas do capsídeo L1 e L2 (quadro 1). Ademais, o genoma é composto de uma região reguladora LCR (Long Control Region) e URR (Upstream Regulatory Region), variando de 400 a 1000 pbs, localizadas entre as regiões L1 e E6. Nessa região existem sequências ativadoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação (Chang, 1990; Longworth and Laiminis, 2004; Souto *et al.*, 2005).

	Proteína	Localização	Função
Early Proteínas Regulatórias	E1	Núcleo	Replicação
	E2	Núcleo	Replicação/transcrição
	E4	Citoplasma	Expressão corresponde ao começo da amplificação do genoma viral
	E5	Citoplasma	Transformação celular
	E6	Núcleo	Transformação celular, ativador transcricional
	E7	Núcleo/citoplasma	Transformação celular
Late Proteínas Estruturais	L1	Núcleo	Compõe o capsídeo viral, papel na infecção
	L2	Núcleo	Compõe o capsídeo viral, papel na infecção e organização do DNA viral.

Quadro 1: Proteínas expressas pelos Papilomavírus, localização e funções (Bocaneti *et al.*, 2014).

Segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2014) os papilomavírus são classificados em 29 gêneros de acordo com a diversidade de sequências nucleotídicas da ORF (*Open Reading Frame*) do gene *L1*. Diferenças acima de 10% entre duas sequências de DNA da mesma ORF definem um novo tipo de viral; diferenças entre 2 e 10% definem um novo subtipo viral (De Villiers *et al.*, 2004).

Atualmente, existem 14 tipos de BPV (BPV -1 a -14) descritos na literatura, *Deltapapillomavirus* (BPV -1,2, 13 e 14), *Epsilonpapillomavirus* (BPV -5 e 8), *Xipapillomavirus* (BPV -3,4,6,9,10,11,e 12) e *Dyoxipapillomavirus* (BPV 7) (Lunardi *et al.*, 2012, Bocaneti *et al.*, 2014; Munday *et al.*, 2015; Lunardi *et*

al., 2016). Além destes, há mais de 16 supostos novos tipos de BPVs (White, Howley, 2013).

2.2 Infecção por papilomatose bovina - BPV

A infecção por papilomavírus ocorre inicialmente na camada basal, geralmente por meio de microlesões na pele ou mucosas. Em seguida, as células infectadas se dividem ocasionando uma expansão lateral. As células-filhas migram para a camada supra-basal, onde são ativados genes que replicam o DNA viral e formam o capsídeo protéico (Figura 2). Partículas virais são formadas e liberadas para a superfície, podendo infectar tecidos adicionais (Zur Hausen, 2002). O vírus infecta as células basais do epitélio ou os fibroblastos, formando projeções digitiformes microscópicas ou macroscópicas características (Monteiro *et al.*, 2008).

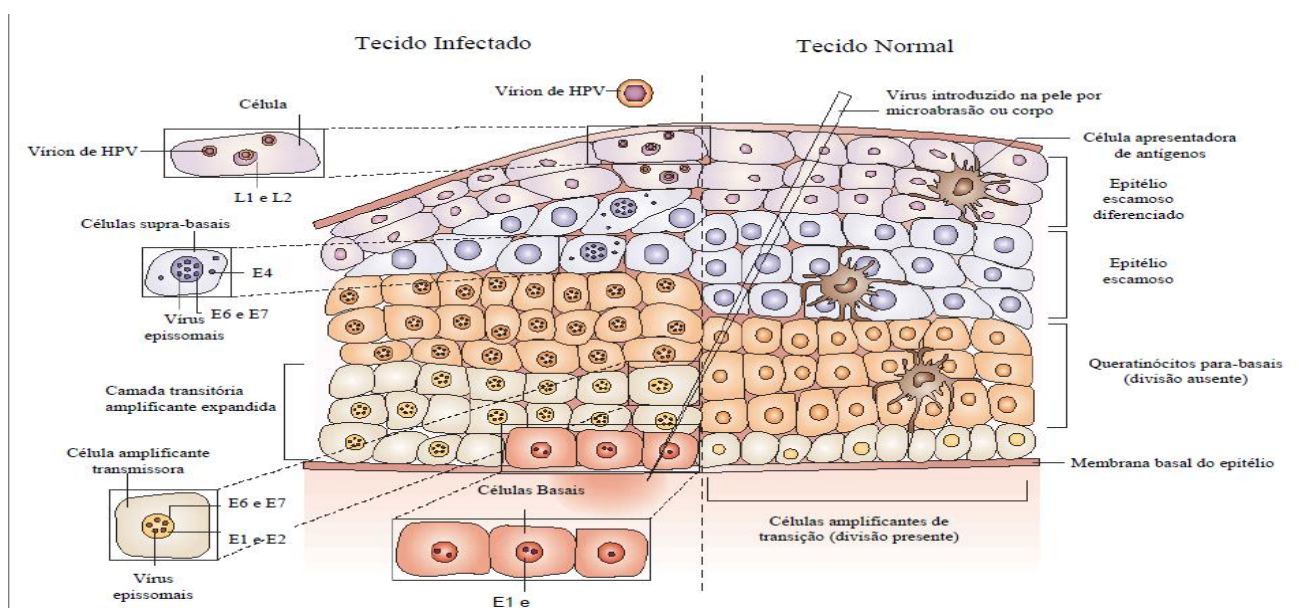


Figura 2: Estágios do ciclo viral do papilomavírus em epitélio estratificado escamoso (modificado a partir de Frazer, 2004).

De acordo com a intensidade e do número de lesões, poderão ocorrer debilitação e alterações funcionais orgânicas ocasionadas pelos tumores. Infecções bacterianas secundárias podem resultar em perda de condição corporal. A hemorragia e miíase de verrugas traumatizadas também são comuns e podem resultar na morte do animal. Dificuldades na lactação e no coito também são relatadas, em decorrência da obstrução física (Mello e Leite, 2003).

O BPV pode ser contraído diretamente por inoculação cutânea (Stringfellow *et al.*, 1988), por contato direto, indireto (cercas, bebedouros, cordas, moscas, ordenhadeira), ou pela via transplacentária (Campo, 1997; Murphy *et al.*, 1999).

Na forma cutânea, a detecção clínica da doença é simples, sendo baseada apenas na verificação da presença de verrugas ou papilomas. No entanto, o diagnóstico de lesões nos sistemas digestivo, respiratório e nas lesões no trato urinário, torna-se mais laborioso, permitindo que as formas benignas se desenvolvam em tumores malignos, impossibilitando a tentativa de tratamento (Corrêa e Corrêa, 1992).

A infecção pelo papilomavírus bovino (BPV) causa lesões hiperplásicas, definidas como verrugas ou papilomas, que ocorrem na pele e mucosas (Bocaneti *et al.*, 2014) (Figura 3).



Figura 3: Animais infectados por papilomavírus bovino (BPV). A. Fibropapilomas na cabeça e pescoço causados por BPV2. B. Papilomas epiteliais em tetas causados por BPV6. C. Fibropapilomas no pênis causados por BPV1 (Hatama, 2012).

As lesões cutâneas geralmente se encontram distribuídas em grande número pelo corpo do animal infectado, não manifestando predileção por sexo ou raça (Campo, 2002; Mello e Leite, 2003; Carvalho, 2012) (Figura 4).

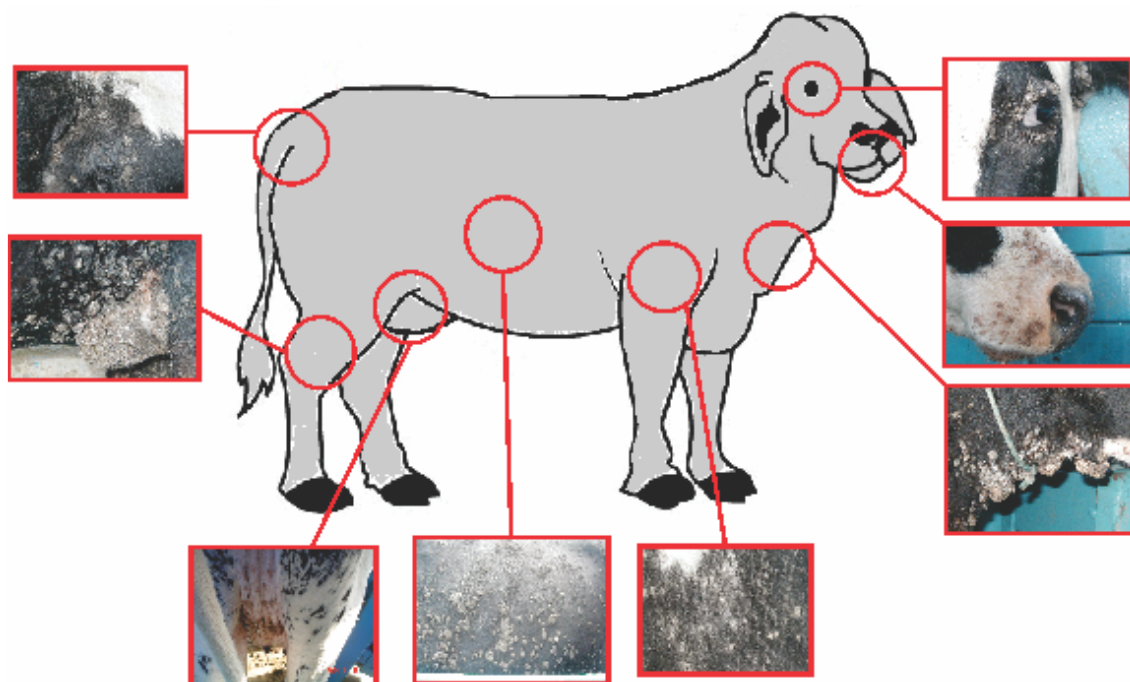


Figura 04: Representação esquemática de papilomatose bovina em diferentes localizações no bovino (Freitas *et al.*, 2011).

Os papilomas são classificados em 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. O tamanho varia e apresentam uma aparência seca, córnea e semelhante à couve-flor (Mello e Leite, 2003).

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 (Mello e Leite, 2003). Os papilomas pedunculares são neo-formações que sobressaem à pele como prolongamentos de diferentes longitudes e que podem apresentar-se em forma de dígitos, são muito comuns nas tetas e úbere, mas são de difícil tratamento, com as verrugas nas tetas provocando dificuldade durante a ordenha (Wadhwa *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2012).

Os papilomas, ou tumores, podem ser formados na mucosa do trato gastro-intestinais e bexiga, e em alguns casos podem progredir para carcinomas, principalmente quando associadas à co-fatores ambientais, como na alimentação com o broto da samambaia *Pteridium aquilinum* (Campo, 2006). A *Pteridium aquilinum* é uma planta invasora, que tem a sua distribuição por várias regiões como as tropicais e temperadas, infestam campos e possuem agentes imunossupressores e mutagênicos. O consumo da samambaia pelo gado pode ocasionar o desenvolvimento de hematúria

enzoótica e câncer de bexiga urinária (Borzachielo *et al.*, 2003; Campo, 2006; Bocaneti *et al.*, 2014).

Os tumores do trato alimentar são os mais comuns induzidos por BPV. Esses tumores, induzidos por BPV4, quando associados ao consumo de *P. aquillinum*, podem evoluir para o carcinoma celular escamoso. Lesões na bexiga urinária induzidas por BPV1 e -2 também podem progredir para o câncer (Campo, 2002; Borzacchiello, 2007) (Figura 5).



Figura 5: Carcinomas induzidos por BPV. A Câncer de Bexiga; B Progressão de papiloma a câncer do trato gastro-intestinal superior (Campo, 2002; Borzacchiello, 2007).

Embora descritos como vírus epiteliotrópicos, o papilomavírus bovino tem sido encontrado em sangue e em outros sítios não epiteliais (Freitas *et al.*, 2007; Lindsey *et al.*, 2009). Células sanguíneas com o genoma de BPV ativo podem ser responsáveis por disseminar o BPV para diversos órgãos (Freitas *et al.*, 2003; 2007; Roperto *et al.*, 2011).

Segundo a literatura há descrição de co-infecções em todo o mundo com diferentes tipos de BPV. Ogawa *et al.* (2004) descreveram no Japão a presença de BPV em até quatro tipos diferentes e de supostos novos tipos de BPV no mesmo papiloma em rebanhos. No Brasil, a presença simultânea de BPV1 e BPV2 foi detectada em uma mesma lesão (Yagui *et al.*, 2006, 2008, Lindsey *et al.*, 2009). Além disso, foram verificadas cinco combinações

diferentes de infecção múltipla por BPV em bovinos (Claus *et al.*, 2009). A co-infecção com BPV1 e BPV2 descrita na Índia (Leishangthem *et al.*, 2008; Pangty *et al.*, 2010). Co-infecção com BPV1 e BPV11 foi analisada utilizando um ensaio de genotipagem multiplex BPV em bovinos na Alemanha (Schmitt *et al.*, 2010) e no Brasil, utilizando *primers* específicos para os tipos de BPV, foi observada co-infecção por vários tipos de BPVs (Carvalho *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013).

O progresso da infecção está relacionado com a eficiência imunológica do hospedeiro. As condições estressantes podem levar a uma baixa da imunidade do hospedeiro facilitando o surgimento da doença (Silva *et al.*, 2013c).

2.3 Importância econômica

O BPV tem ocorrência mundial, e é clinicamente caracterizado pela presença de lesões hiperproliferativas (papilomas) que acometem o tecido cutâneo e mucoso, causando prejuízos econômicos (Carvalho *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2012).

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo com cerca de 200 milhões de cabeças distribuído em gado de corte e de leite. O valor bruto da produção desses dois segmentos é estimado em R\$ 67 bilhões, com presença de atividades em todos os estados brasileiros, evidenciando a importância econômica e social da bovinocultura (Mapa, 2015).

O Brasil lidera o ranking de maior exportador de carne bovina do mundo desde 2008 e as estatísticas mostram crescimento também para os próximos

anos. A exportação de carne bovina crescerá a 2,15% ao ano, enquanto a carne de aves a 3,64% (Mapa 2015). Um percentual de 84%, da carne bovina produzida no Brasil atende ao mercado interno, o que corresponde a um consumo médio de 37 kg por habitante, por ano (Mapa 2015).

Segundo a Pesquisa Pecuária Municipal realizada pelo IBGE, com informações sobre a produção brasileira de leite em 2014. A produção de leite no Brasil foi de 35,17 bilhões de litros, representando um aumento de 2,7% em relação à registrada no ano anterior. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture - USDA), o Brasil ocupou a quinta posição no ranking mundial de produção de leite em 2014, atrás da União Europeia, Índia, Estados Unidos e China (Deral 2015).

Em rebanho leiteiro, a presença de verrugas no teto dificulta a ordenha, com consequentes infecções secundárias, além de reduzir a produção do animal (Wadhwa *et al.*, 1995; Campo 2002). O bovino afetado por papilomatose pode apresentar problemas como hemorragias, infecções secundárias e feridas mecânicas que ocorrem devido à fricção dos papilomas grandes ou aglomeradas, podendo levar a transtornos gerais tóxicos e até a septicemia (Melo e Leite 2003; Silva, 2013b).

A papilomatose bovina gera importantes prejuízos econômicos à pecuária, pois leva à queda da produção leiteira decorrente de quadros de mastites e obstrução dos tetos. Nestes casos, a higienização é complexa e interfere no fluxo do leite, podendo levar a sangramento do teto, dor na ordenha e dificuldade de encaixe da ordenhadeira mecânica (Monteiro *et al.*, 2008; Muro *et al.*, 2008).

A doença também leva à depreciação do couro, com consequente diminuição do valor de mercado variando de 30% á 60% em desvalorização nos animais com papilomatose bovina. As lesões de trato digestório superior e da bexiga urinária podem evoluir para o câncer devido à ação sinérgica com co-fatores ambientais (Borzacchiello; Roperto, 2008).

2.4 Epidemiologia, diagnóstico e tratamento da papilomatose bovina

A papilomatose bovina tem distribuição mundial. Nos bovinos a mais comum é a papilomatose cutânea, da mucosa genital e a orofaríngea. Não há predileção por sexo ou raça, no entanto a doença é mais comum em animais com idade inferior a dois anos (Eisa *et al.*, 2000), ou a três anos de idade (Corrêa e Corrêa, 1992) (Figura 6).

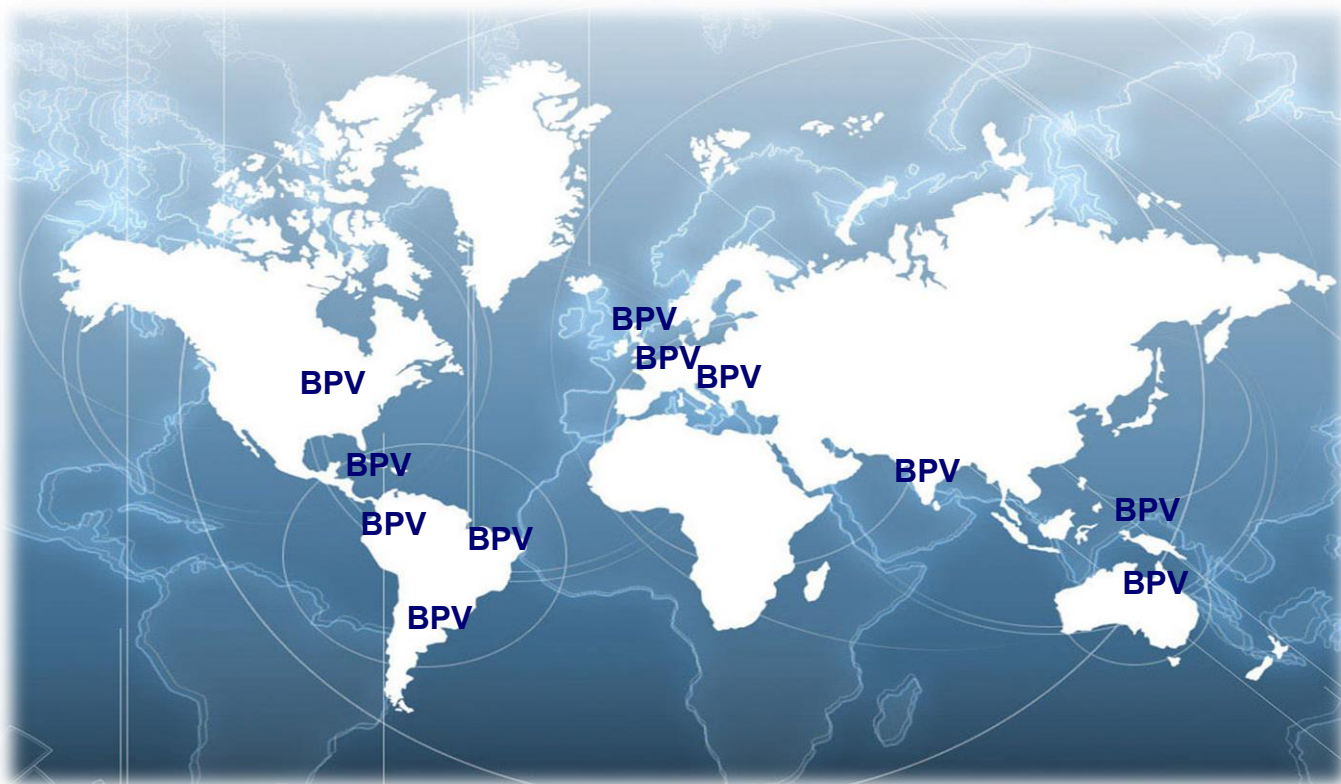


Figura 6: Distribuição da papilomatose bovina no mundo (Freitas *et al.*, 2011).

A morbidade é muito variável, havendo propriedades onde ocorrem poucos casos e outras em que 20% e até uma maior porcentagem dos bovinos apresentam a doença (Corrêa e Corrêa, 1992).

A letalidade é baixa e, quando ocorre, é ocasionada pelo enfraquecimento do animal e pela presença de grande quantidade de papilomas ou pela ocorrência de miíases, que aparecem quando os papilomas são extirpados por traumatismos (Corrêa e Corrêa, 1992). O período de incubação e o aparecimento das lesões variam de três semanas a quatro meses (Mayr e Guerreiro, 1988; Foz Filho *et al.*, 2002). O reservatório é o próprio animal e o curso da doença é geralmente longo (Corrêa e Corrêa, 1992).

Em aproximadamente 85% dos casos, a doença tem característica autolimitante, apresenta regressão espontânea com o desaparecimento das lesões, mesmo sem a instituição de qualquer tratamento (Dulbecco e Ginsberg, 1979; Murphy *et al.*, 1999). Uma vez madura, com seu crescimento completo, a verruga sofre necrose e queda espontânea associada principalmente, à resposta imunocelular do hospedeiro (Santos *et al.*, 2002).

A papilomatose cutânea em bezerros costuma regredir no prazo de um ano ou menos; entretanto em vacas, a tendência é não regredir, principalmente na forma do papiloma plano (Corrêa e Corrêa, 1992). De acordo com Turk *et al.* (2005), os tumores frequentemente regredem espontaneamente, entretanto, podem persistir e, na presença de cofatores genéticos e/ou ambientais, podendo progredir para um câncer.

A expressão clínica da doença é característica, tornando o diagnóstico clínico fácil pela simples observação dos papilomas a olho nu (Russel e

Edington, 1985; Corrêa e Corrêa, 1992; Romanos *et al.*, 2002). O desenvolvimento de técnicas moleculares possibilitou - se uma revolução no diagnóstico de doenças infecciosas, principalmente com as aplicações da reação em cadeia da polimerase (PCR). A técnica da PCR possui alta sensibilidade e especificidade, além da facilidade de utilização para detecção de qualquer sequência genética conhecida, sem requerer o cultivo viral. Outras técnicas de hibridização como o “Southern blot”, “Western blot”, “Dot blot” e hibridização *in situ* (ISH) também são utilizadas na detecção dos papilomavírus (Wosiacki *et al.*, 2002; Jelínek e Tachezy, 2005; Roperto *et al.*, 2008).

Os animais com baixa imunidade são os mais suscetíveis ao ataque da doença, sendo que a condição imunológica pode ter sido afetada por consequência de estresse ou desbalanço nutricional. A presença de animais infectados no rebanho também pode ser resultante do manejo adotado, principalmente quando a densidade animal está alta, o ambiente mal ventilado, com baixa incidência solar, úmido e sujo (Santin 2001; Marins 2004; Silva *et al.*, 2004; Andrews *et al.*, 2008; Mancilha 2013).

O principal meio de controle da doença ocorre pelo fortalecimento do sistema imunológico dos animais acometidos pela papilomatose bovina. Os tratamentos químico-corrosivos, como cauterização com soda, ácidos, nitrato de prata e outros produtos são meios de desencadear uma reação imunológica positiva e promover a cura (Santin 2001; Marins 2004; Silva *et al.*, 2004; Andrews *et al.*, 2008; Mancilha, 2013).

Nos métodos empírico-científicos as verrugas são amarradas, cortadas ou arrancadas, e o princípio da alternativa também está relacionado ao estímulo dos anticorpos contra o papilomavirus. Também existem meios

homeopáticos e fitoterápicos para controlar a papilomatose bovina, que causam irritação e, por consequência, desencadeiam um estímulo no sistema imunológico (Santin 2001; Marins 2004; Silva *et al.*, 2004; Andrews *et al.*, 2008; Mancilha 2013).

Auto-hemoterapia, procedimento que consiste na retirada de 10 á 40 mL de sangue e a aplicação imediata do sangue por via intramuscular profunda gerando um estímulo no sistema imune inespecífico, levando à queda dos papilomas (Muro *et al.*, 2008). Pode estar associada ao uso de clorobutanol e babesicida para obter melhores resultados (Santin 2001; Marins 2004; Silva *et al.*, 2004; Andrews *et al.*, 2008; Mancilha 2013).

Outro procedimento recomendado para controle da papilomatose bovina é a aplicação da autovacina nos animais. A autovacina é realizada com a retirada de parte das verrugas, que são posteriormente trituradas e misturadas com formol em solução fisiológica (Santin 2001; Marins 2004; Silva *et al.*, 2004; Andrews *et al.*, 2008; Mancilha 2013).

Além dos métodos citados, existem vários medicamentos no mercado, como o “Papilomax” produzido pela Embrapa. Entretanto, a resposta dos animais geralmente é variável para as substâncias disponíveis, podendo ser satisfatória ou não (Santin 2001; Marins 2004; Silva *et al.*, 2004; Andrews *et al.*, 2008; Mancilha 2013).

2.5 Fator de Necrose Tumoral (TNF-alfa)

O fator de necrose tumoral (TNF-alfa) foi identificado como um fator solúvel no soro capaz de provocar a necrose de células tumorais (Carswell *et*

al. 1975). Trata-se de uma citocina pró-inflamatória, que possui importantes funções, tais como a indução de outras citocinas e mediadores lipídicos da inflamação, de proliferação, diferenciação celular e apoptose (Bemelmans *et al.*, 1996; Togbe *et al.*, 2007; Tracey *et al.*, 2008).

O TNF- α possui papel imunomodulador importante, participando da resposta do hospedeiro em condições inflamatórias agudas e crônicas (Hajeer & Hutchinson, 2001). Promove o aumento da expressão de moléculas de adesão, aumentando a circulação de células nos sítios de infecção, estimulando macrófagos e neutrófilos a realizar fagocitose, e também a liberação de outras citocinas e mediadores inflamatórios. A expressão de TNF- α nos estados infecciosos está relacionada com a maioria dos sintomas clínicos presentes, tais como a febre e reações inflamatórias locais. No entanto, quando produzido em excesso ou liberado de forma sistêmica em grandes quantidades, pode levar a complicações fatais, tais como colapso circulatório e falência múltipla de órgãos (Murphy 2010).

O TNF- α presente nos macrófagos é liberado por inúmeros estímulos, como por exemplo, componentes de bactérias, protozoários e algumas células tumorais, mediadores lipídicos, imuno complexos e citocinas, que estimulam a produção de TNF- α , liberando uma cascata de mediadores inflamatórios (Bemelmans *et al.*, 1996; Togbe *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2007; Tracey *et al.*, 2008).

As células endoteliais expressam moléculas de adesão para os leucócitos produzirem prostaciclina que é vasodilatadora, proporcionando condições necessárias para a chegada dos leucócitos ao foco inflamatório. O TNF- α induz a liberação de quimiocinas que ajudam na captura de leucócitos

e estimulam a expressão de proteínas pro-coagulantes, levando à formação do trombo (Bradley 2008). Os leucócitos ativados pelo *TNF-alfa* produzem espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, essenciais para a eliminação de microrganismos (Liew *et al.*, 1990; Megyeri *et al.*, 1995; Tracey *et al.*, 2008).

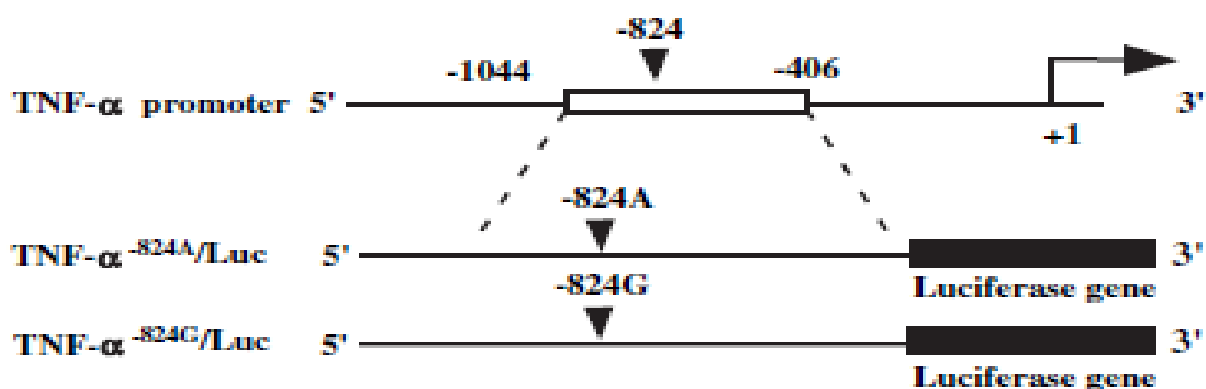
O *TNF-alfa* é de importância central nas dinâmicas virais, porque é um fator de proteção contra progressão de várias infecções (Guidotti *et al.*, 2000; Herbein *et al.*, 2000). No caso de tumores, essa citocina parece ser responsável pela maior parte da atividade tumoricida dos monócitos e pode desempenhar alguma função na ação das células linfóides citotóxicas (Igansi, 2009).

O *TNF-alfa* e sua associação com a progressão da doença em infecções agudas e crônicas e doenças autoimunes em humanos está bem estabelecida (Kassiotis, 2001; Blandizzi *et al.*, 2014, Cigni *et al.*, 2014; Lendez *et al.*, 2015). Na infecção pelo HPV, o *TNF-alfa* participa induzindo a apoptose de células infectadas pelo vírus e de células tumorais. Desta forma, há estimulação da resposta inflamatória por citocinas, que controlam o crescimento da infecção viral (Desphande *et al.*, 2005).

Alterações nos níveis de *TNF-alfa* podem influenciar na resposta imune a diversos patógenos que estão associados com doenças infecciosas. Foi demonstrada a associação entre um polimorfismo de microssatélite no gene *TNF-alfa*, com infecção pelo HPV-16 e com neoplasia intraepitelial cervical (NIC), quando combinados com o alelo do gene HLA-DQB (Desphande *et al.*, 2005). Segundo Fernandes *et al.* (2008), o genótipo G/G ou a presença do alelo G na região - 308 confere ao indivíduo um fenótipo de baixa produção desta citocina; os genótipos A/G e A/A, apresenta um fenótipo de alta

produção. A baixa produção desta citocina está relacionada com a presença de lesões de baixo grau (LSIL), enquanto a alta produção com lesões de alto grau (HSIL) e câncer cervical invasivo em humanos (Duarte *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2008).

Em bovinos, o gene *TNF-alfa* apresenta polimorfismo na região promotora (-824A ou -824G) associado com o aumento da progressão do linfoma induzido pelo vírus da Leucemia Viral Bovina (BLV) (Konnai *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012; Pumerissun *et al.*, 2013) (Figura 7). No entanto, em



relação ao BPV e doenças associadas, não há nenhum dado na literatura.

Figura 7: SNP na região promotora do gene *TNF-alfa* (-1044 a -406) associado à Leucemia Viral Bovina (BLV) (Konnai *et al.*, 2006).

2.6 Lectina Ligante de Manose (MBL)

O sistema complemento é composto por 35 proteínas plasmáticas aproximadamente, associadas à membrana celular, sendo uma das principais vias efetoras da resposta imunológica e inflamatória. Essas proteínas, quando ativadas em forma de cascata por meio de clivagens proteolíticas sequenciais e com a formação de complexos de proteínas, desempenham importante papel

na manutenção da homeostase do hospedeiro. Porque combatem microrganismos e removem complexos imunes circulantes e células apópticas (Abbas *et al.*, 2000; Tulamo *et al.*, 2010).

A cascata do sistema complemento é ativada por três diferentes vias: a clássica, a alternativa e a das lectinas (Gulla *et al.*, 2009). Esta última via consiste em moléculas padrão de reconhecimento, a MBL (Schlapbach *et al.*, 2010). A proteína MBL é o principal componente de ativação da via das lectinas do sistema complemento, sendo responsável por mediar um efeito antimicrobiano através da formação do complexo de ataque à membrana (Garcia-Laorden *et al.*, 2008)

A MBL é um importante componente do sistema imune inato, pertence a uma família de proteínas designada colectinas, devido à presença de uma região de colágeno e um domínio de lectina. É uma proteína de fase aguda secretada pelos hepatócitos que possui em sua forma oligomérica, domínios que reconhecem e ligam à molécula de N-acetilglicosamina ou manose presentes na superfície de patógenos que podem então ser fagocitados por macrófagos ou destruídos através do sistema complemento (Hartshorn *et al.*, 1993).

A forma circulante da proteína MBL é composta por multímeros de cadeias polipeptídicas idênticas de 32 kDa, possuindo em cada cadeia quatro regiões distintas codificadas por éxons diferentes do gene *MBL2* (Dommett *et al.*, 2006; Ip *et al.*, 2009). Cada cadeia possui uma região C-terminal, de domínio de reconhecimento de carboidratos cálcio-dependente (DRC), através do qual a proteína MBL se liga aos diferentes tipos de patógenos; um domínio hidrofóbico α -helicoidal, uma região que se assemelha ao colágeno contendo

19 trincas Gly-Xaa-Xaa e uma região N-terminal rica em cisteína (Araújo 2009; Dommett *et al.*, 2006).

A proteína MBL, no soro, consiste de oligômeros, variando de dímeros a hexâmeros, que formam uma estrutura quaternária, ocasionada por uma interrupção na região colagenosa, originando uma torção/dobradiça, segundo estudos de cristalografia de raios-x/eletromicrografias (Dommett *et al.*, 2006). A MBL liga-se a açúcares como D-manose, L-fucose e N-acetil-D-glucosamina na superfície de vírus, bactérias e fungos, levando à ativação do complemento. Além das estruturas de açúcar, a proteína MBL também pode se ligar a fosfolipídios (Kilpatrick, 1998), ácidos nucleicos (Palaniyar *et al.*, 2004) e proteínas não-glicosiladas (Ip *et al.*, 2009).

A ligação da proteína MBL ao patógeno ativa simultaneamente serinoproteases específicas responsáveis pela ativação do sistema complemento. A concentração sérica da MBL pode variar de acordo com a presença de polimorfismos na região codificante e/ou na região promotora do gene *MBL2* (Tuner, 1996).

Os polimorfismos na região promotora resultam na diminuição de expressão da molécula da MBL, enquanto que, na região codificante as mutações causam incapacidade de manter a conformação oligomérica necessária para fixar manose e ativar o complemento levando também a baixos níveis séricos (Garred *et al.*, 2003). Essas mutações são associadas ao curso desfavorável não só de infecções bacterianas, mas também, às causadas por vírus (Thomas *et al.*, 1996).

Variações na sequência de nucleotídeos foram encontradas em ambas as regiões codificantes e nas regiões não codificadoras do gene de *MBL* em

humanos, ovinos e suínos. Essas variações podem afetar a montagem ou formação da proteína MBL, levando assim a um baixo nível e disfunções imunológicas inatas plasmáticas (Madsen *et al.*, 1998; Lillie *et al.*, 2007; Thiel and Gadjeva, 2009; Juul-Madsen *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011).

O primeiro caso de associação entre doenças e deficiência de MBL data de 1968, (Miller e colaboradores 1968). Nesse estudo foi observado que uma paciente sofria de infecções bacterianas recorrentes não responsivas à antibioticoterapia e esteróides, e que devido a uma deficiência de um fator do plasma, embora desconhecido na época, era a proteína MBL (Worthley and Bardy, 2005). Desde então, a deficiência de MBL vem sendo relacionada ao aumento da frequência e severidade das infecções bacterianas, virais e fúngicas em crianças e adultos (Dean *et al.*, 2005).

Os polimorfismos no éxon 1 do gene *MBL2*, com a diminuição da MBL funcional, vem sendo associado a doenças auto-imunes como lúpus eritematoso sistêmico (Monticelo, 2008; Sandrin-Garcia *et al.*, 2011), artrite reumatóide (Ip *et al.*, 2000), doença celíaca (Boniotto *et al.*, 2002), entre outras; visto que essa proteína liga-se a células apoptóticas e restos celulares, contribuindo para eliminação de auto-antígenos (Tsutsumi *et al.*, 2003).

Nos seres humanos, três frequentes SNPs na região codificadora do gene *MBL*, conhecidos como D (Arg52Cys), B (Gly54Asp) e C (Gly57Glu) estão associados com a polimerização anormal, diminuição da concentração sérica e consequente função prejudicada da proteína MBL (Madsen *et al.*, 1994; Sumiya *et al.*, 1991; Lipscombe *et al.*, 1995; Larsen *et al.*, 2004; Roos *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006). Há evidências de que baixos níveis de MBL em humanos

diminuem a ativação do complemento e protegem o hospedeiro de dano tecidual excessivo (Takahashi *et al.*, 2005; Garred *et al.*, 2006; Capparelli *et al.*, 2008).

Em bovinos, a ocorrência de polimorfismos no gene *MBL2* está associada com a falha no controle da mastite, prejudicando assim a produção de leite. A mastite é uma doença inflamatória da glândula mamária, causada por infecções de microrganismos, lesão térmica ou mecânica (Wang *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012).

O gene *MBL2* está localizado no cromossomo 26 em bovinos (Gjerstorff *et al.*, 2004). Contém três íntrons e quatro éxons codificando 249 aminoácidos. Mutações no gene *MBL2* têm contribuído na susceptibilidade de animais a vários agentes infecciosos (Holmskov *et al.*, 2003; Lillie *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2005; Capparelli *et al.*, 2008). Alguns estudos estabeleceram que o polimorfismo no *locus MBL2* de búfalo está associado com a resistência à infecção por *Brucella abortus*, no entanto, são escassas as informações disponíveis sobre o gene *MBL2* e suas variantes, bem como as suas relações com a resistência a doenças (Wang *et al.*, 2012).

O estudo de Polimorfismos de Base Única (SNPs) em genes associados à fisiopatologia e a patogenia de doenças vem sendo desenvolvido e a variação desses genes pode predispor à susceptibilidade ou proteção a doenças (Lin Albertson, 2004; Suffredini Chanock, 2006; Clark Baudouin, 2006).

O número de estudos genéticos que associam polimorfismos genéticos a patologias ou à susceptibilidade a doenças vem crescendo gradativamente (Costa *et al.*, 2007). Como são o caso de polimorfismos associados à

hipertensão (Kimura Lilian, 2010), transtornos neuropsiquiátricos (Souza e Oliveira, 2012), diabetes em seres humanos (Grant *et al.*, 2006). Polimorfismos associados com o BLV e o gene do *TNF-alfa* em bovinos (Konnai *et al.*, 2006), polimorfismos associados a mastite bovina e o gene da *MBL2* (Wang *et al.*, 2012).

No Estado de Pernambuco não foram detectados até momento os novos tipos de BPV (-11, -12, -13 e -14) de acordo com a literatura. O nosso trabalho tem como um dos objetivos, identificar a presença desses novos tipos de BPVs, em sangue e em lesões cutâneas.

Não há registros na literatura de estudos de associação dos polimorfismos dos genes *TNF-alfa* e *MBL2* e a infecção pelo BPV, e sua relação com o desenvolvimento de lesões. Desta forma, o presente estudo busca avaliar a ocorrência de SNPs nos genes *TNF-alfa* e *MBL2* em animais infectados pelo BPV, e sua possível associação entre estes SNPs e o desenvolvimento de lesões cutâneas em bovinos.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Identificar os tipos de papilomavírus bovino (BPV) presentes em tecido sanguíneo e em lesões cutâneas, em bovinos da região de Pernambuco, Nordeste do Brasil. Avaliar a associação entre polimorfismos genéticos do genoma de bovinos e a susceptibilidade para a papilomatose bovina.

3.2 Objetivos específicos

1. Genotipar os tipos de Papilomavírus bovino (BPVs) e investigar em tecido sanguíneo e em lesões cutâneas;
2. Descrever as principais co-infecções causadas pelo Papilomavírus bovino (BPVs), encontradas em lesões cutâneas e em tecido sanguíneo;
3. Realizar um estudo de associação entre os polimorfismos na região promotora do gene *TNF-alfa* e lesões papilomatosas em bovinos;
4. Realizar um estudo de associação entre os polimorfismos do exon 1 do gene *MBL2* e lesões papilomatosas em bovinos;

4. Material e Métodos

4.1 Descrição da área estudada

O Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) – Estação Experimental de Itambé (EEI) atua nas seguintes áreas de pesquisa: fruticultura, milho, mandioca, café Conilon, cana-de-açúcar, gramíneas forrageiras, alimentação e melhoramento animal. Produção e comercialização de mudas frutíferas. Produção e comercialização de bovinos. A estação está localizada no município de Itambé, Pernambuco, apresenta uma área de 240 ha, e está a 120 Km da capital pernambucana.

4.2 Obtenção das amostras

No presente estudo foram avaliados 127 bovinos da raça Girolando 5/8, provenientes da EEI. Os bovinos com idade variando entre 1 a 16 anos e todas fêmeas.

Os animais foram identificados através de brincos numerados, criados de forma semi-intensiva, com alimentação a base de capim elefante (*Penisetum purpureum*), água e sal mineral comercial específico para bovinos *ad libitum*.

Os bovinos do presente estudo foram divididos em dois grupos. Grupo 1: animais apresentando lesões cutâneas e Grupo 2: animais sem lesões

cutâneas (tabela 1). A organização dos bovinos em grupos foi possível a partir de dados clínicos e registros clínicos da EEI.

Para o estudo de associação de polimorfismos nos genes *MBL2* e *TNF-alfa* e lesões papilomatosas foram acrescentadas ao estudo 60 amostras de DNA de bovinos da raça Girolando 5/8, pertencentes ao estoque do LEMTE. Esses animais foram originários de fazendas do Recôncavo Baiano, Bahia, Brasil.

4.3 Coleta de material

As amostras foram coletadas pelos veterinários da EEI segundo as normas técnicas da FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) para a remessa de amostras para diagnóstico laboratorial veterinário (Fepagro, 2011).

Foram coletadas 127 amostras de sangue por venopunção com o auxílio de tubos a vácuo de 5mL contendo EDTA. Destes animais foram coletadas 35 amostras provenientes de lesões, com o auxílio de lâminas de bisturi. Por conseguinte foi realizada a extração de DNA total com o auxílio do kit *Blood and Tissue* (Qiagen, Alemanha), seguindo o protocolo do fornecedor. O DNA extraído foi quantificado com o auxílio do equipamento NanoVue (GE, Alemanha).

4.4 Genotipagem

4.4.1 PCR β -globina bovina

A viabilidade das amostras de DNA para serem usadas como *template* foi avaliada por PCR para o gene da β -globina bovina. Foi utilizado 100 ng de DNA e o kit Master mix (Promega, USA). As reações foram realizadas nos mesmos parâmetros descritos por Freitas *et al.*, (2007) e os produtos de amplificação (12 μ L) submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

4.4.2 Detecção de Papilomavírus bovino (BPV) em tecido sanguíneo

Para realização da genotipagem dos BPVs presentes nas amostras de tecido sanguíneo, foram utilizados *primers* específicos: BPV1, BPV2, BPV3, BPV4, BPV5, BPV6, BPV8, BPV9, BPV10, BPV11, BPV12, BPV13 e BPV14 de acordo com as condições descritas por Silva *et al.*, (2011).

4.4.3 Genotipagem amostras de lesão cutânea

Na genotipagem dos BPVs das amostras provenientes de lesões, foram utilizados os *primers* específicos: BPV1, BPV2, BPV3, BPV4, BPV5, BPV6, BPV8, BPV9, BPV10, BPV11, BPV12. Nas amostras de oriundas de lesões cutâneas não foram testados os tipos de BPV7, BPV13 e BPV14.

4.4.4 Genotipagem para o gene *MBL2*

Para o estudo de associação dos polimorfismos do gene *MBL2* na região do exon 1 e lesões papilomatosas foi realizada utilizando a técnica da PCR com *primers* específicos, que amplifica fragmentos de 247 pb. As PCRs foram realizadas de acordo as condições sugeridas por Wang *et al.*, (2012). E os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, purificados e sequenciados.

4.4.5 Genotipagem para o gene *TNF-alfa*

Para o estudo de associação dos polimorfismos no gene *TNF-alfa* (-1044 a -406) e lesões papilomatosas foram realizadas utilizando a técnica da PCR com *primers* específicos, que amplifica fragmentos de 639 pb. As PCRs foram realizadas de acordo as condições sugeridas por Konnai *et al.* (2006). E os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, purificados e sequenciados.

4.5 Sequenciamento e análise dos dados

Os produtos das PCRs específicas para os genes *TNF-alfa* e *MBL2* (9µL) foram submetidos à purificação utilizando os kits comerciais GFX PCR DNA e Band Purification (GE Healthcare) e posteriormente sequenciados com o kit Bigdye Terminator 3.1v (GE Healthcare), em sequenciador automático (3500 Applied Biosystems). Na Plataforma Multiusuário do

Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Foram geradas sequências consenso com base nos valores de Phred 30 ou superiores, com o programa Staden (Staden *et al.*, 2000) e validadas por meio do software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências foram alinhadas utilizando o programa MEGA v. 5.3 (Tamura *et al.*, 2011), foi também utilizado para visualizar e quantificar os polimorfismos.

4.6 Análise estatística

As análises dos SNPs foram realizadas com o auxílio do software SNPStats (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web), admitindo-se um nível de significância de 5% (Solé *et al.*, 2006).

A associação entre os polimorfismos e o desenvolvimento das lesões foi estimada pelo teste de Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95%. A partir das frequências genotípicas observadas foram determinadas as frequências alélicas e as frequências genotípicas esperadas. Mediante a comparação das frequências genotípicas esperadas e observadas foi determinado se a população estava ou não em equilíbrio de Hardy e Weinberg.

A estimativa das diferenças significativas na distribuição dos genótipos foi realizada utilizando o teste de X^2 . A metodologia empregada neste estudo está representada na figura 8.

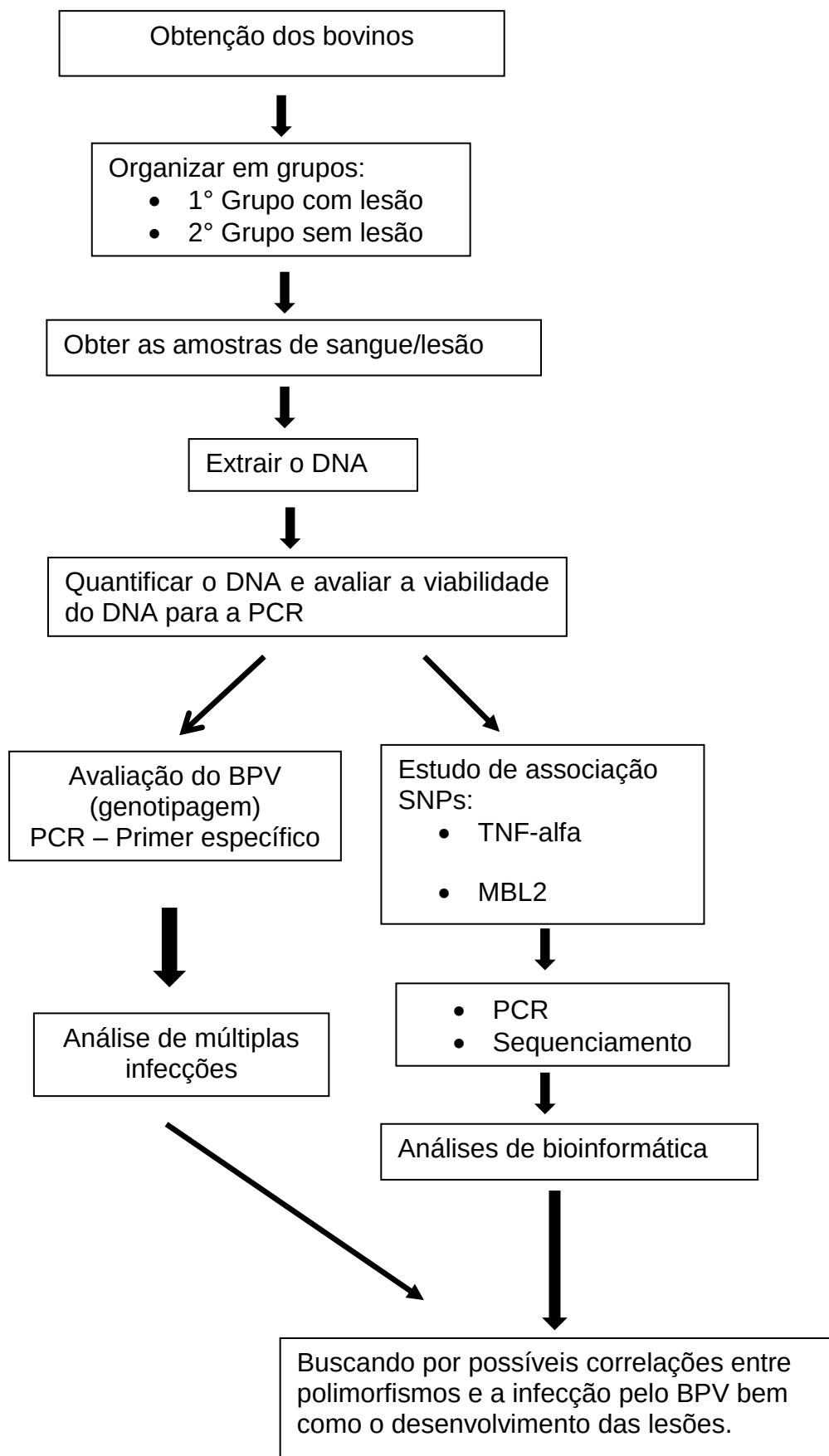


Figura 8: Fluxograma representando a metodologia desse estudo

5. Resultados

No presente estudo um total de 52,75% dos animais apresentaram lesões cutâneas, enquanto 47,25% dos animais não apresentaram nenhuma lesão cutânea.

Os bovinos do presente estudo que apresentaram com lesões cutâneas foram avaliados clinicamente quanto a localização dos sítios de infecção cutânea (Figura 9).

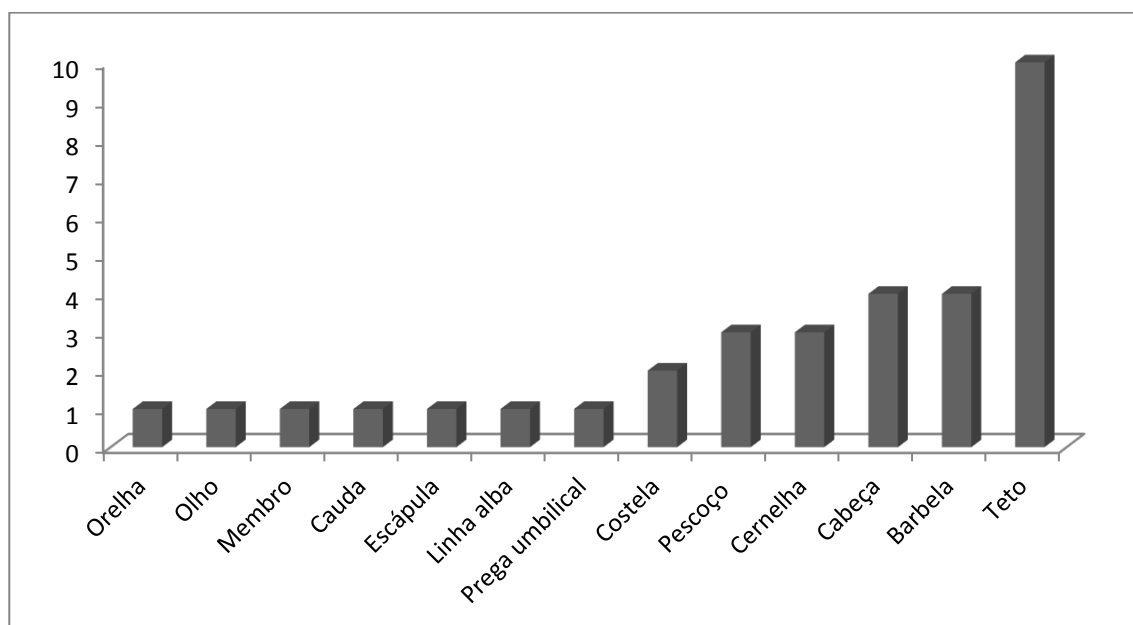


Figura 9: Gráfico representativo da localização dos sítios de infecção das lesões cutâneas em bovinos.

5.1 Genotipagem

5.1.1 PCR *Beta-globina* bovina

Como controle endógeno, todas as amostras de sangue periférico e de lesões cutâneas dos bovinos foram previamente submetidas à PCR para o gene da *β-globina* bovina. Os resultados das PCRs mostraram que todas as

amostras analisadas foram positivas para o gene da *β-globina* bovina, evidenciando a viabilidade das amostras para a detecção do DNA viral e a genotipagem de polimorfismos do genoma bovino (Figura 10).

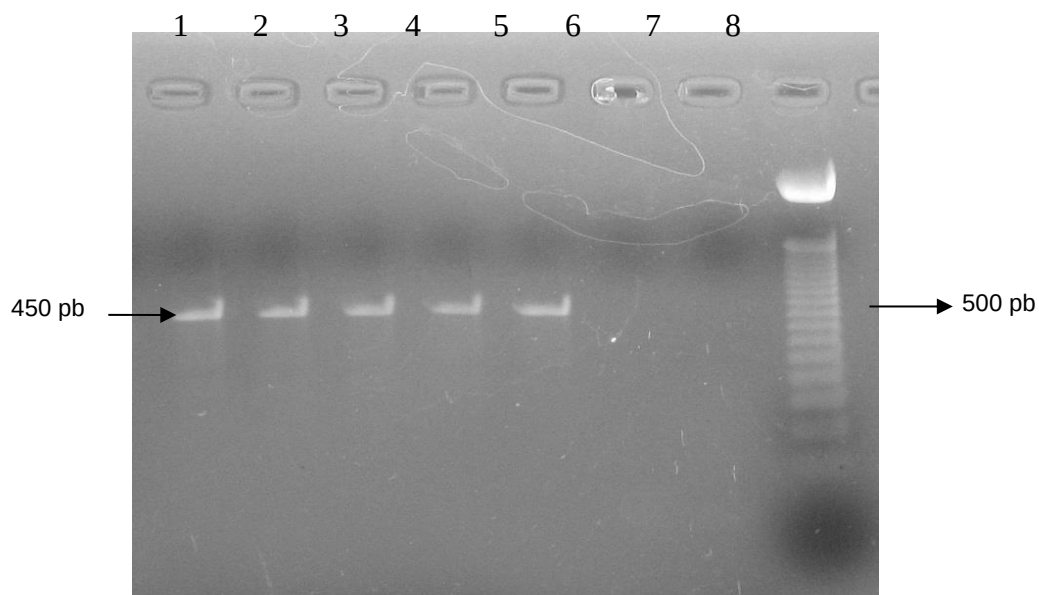


Figura 10: Gel representativo PCR/*β-globina bovina* com amplicons de 450 pb, Linhas: 1 – 4 amostras de sangue de bovinos, 5 controle positivo para o gene da Beta globina bovina, (amostra de sangue bovino, estoque/LEMTE), 6 e 7 controles negativos, 8 marcador de massa molecular 100 pares de bases.

5.1.2 Detecção de Papilomavírus bovino (BPV) em tecido sanguíneo

Os tipos de BPV detectados por PCR tipo-específica em sangue bovino foram os seguintes: BPV 12 (93,70%), BPV 2 (79,52%), BPV 10 (69,29%), BPV9 (62,20%), BPV14 (50,39%), BPV 1 (47,24%), BPV 11 (35,43%), BPV 6 (12,59%), BPV 4 (4,72%) e BPV3 (3,14%) (Figura 11). Os tipos de BPV 5, BPV 8 e BPV 13 não foram detectados em nossa análise. O BPV 7 não foi avaliado no presente estudo.

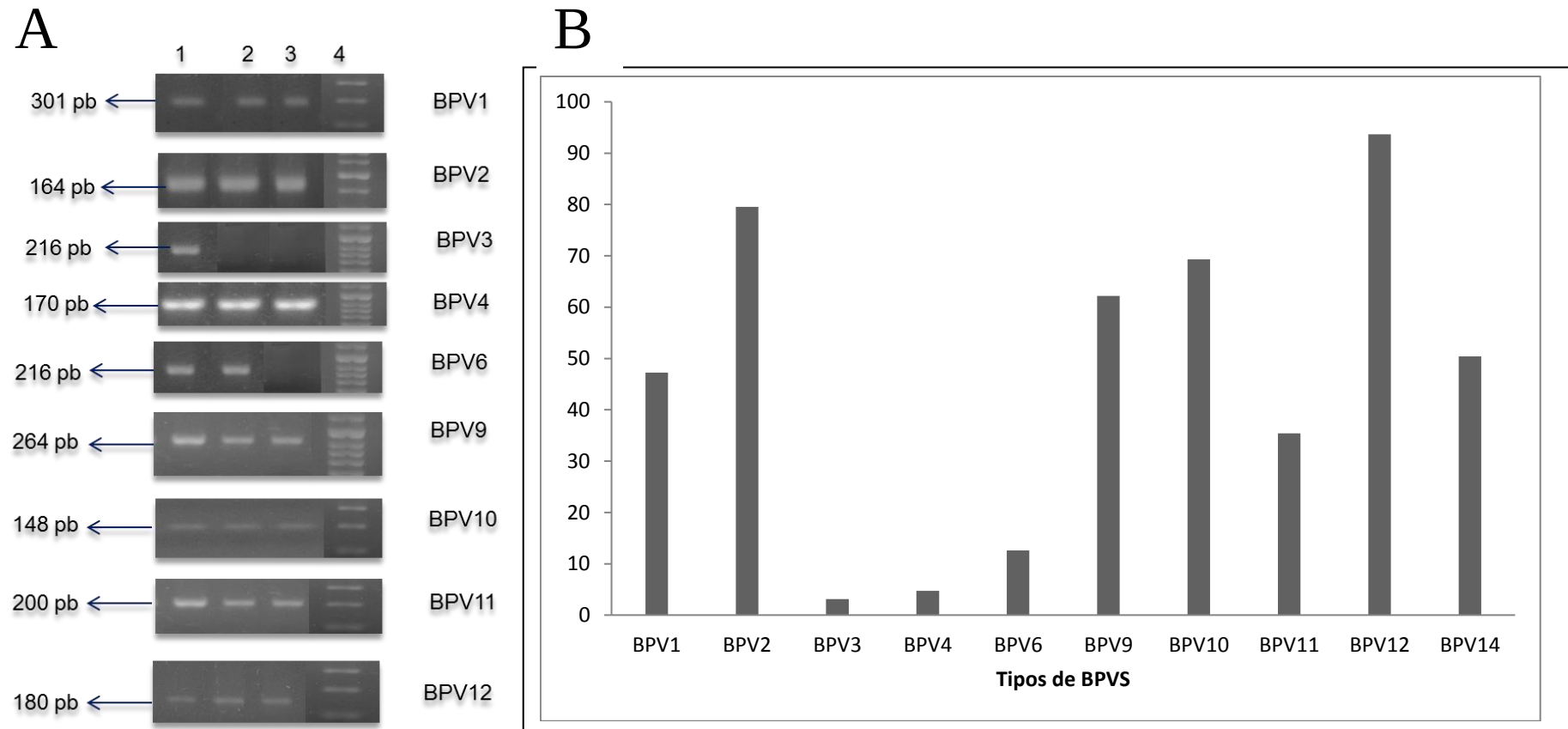


Figura 11: Detecção dos BPVs em sangue periférico de bovinos. A- Eletroforeses de PCRs específicas para os tipos de BPV (-1,-2,-3,-4,-6,-9,-10,-11 e -12), Linhas 1 – 3 amostras positivas, linha 4 marcador de massa molecular 100 pares de bases. B-Distribuição dos tipos de BPVs detectados por PCR específica em sangue bovino, no eixo Y está representado o percentual de amostras, no eixo X os tipos de BPV (-1 a -4, -6, -9 a -12 e -14).

O gênero mais predominante nas amostras de sangue analisadas foi o *Xipapillomavirus*, com um percentual de positividade de 98,42% nas amostras. O *Deltapapillomavirus* apresentou um percentual de 88,12% (Figura 12, tabela 1). O gênero *Epsilonpapillomavirus* não foi detectado nas análises com as amostras de sangue bovino. O gênero *Dyoxipapillomavirus* não foi incluído nas análises.

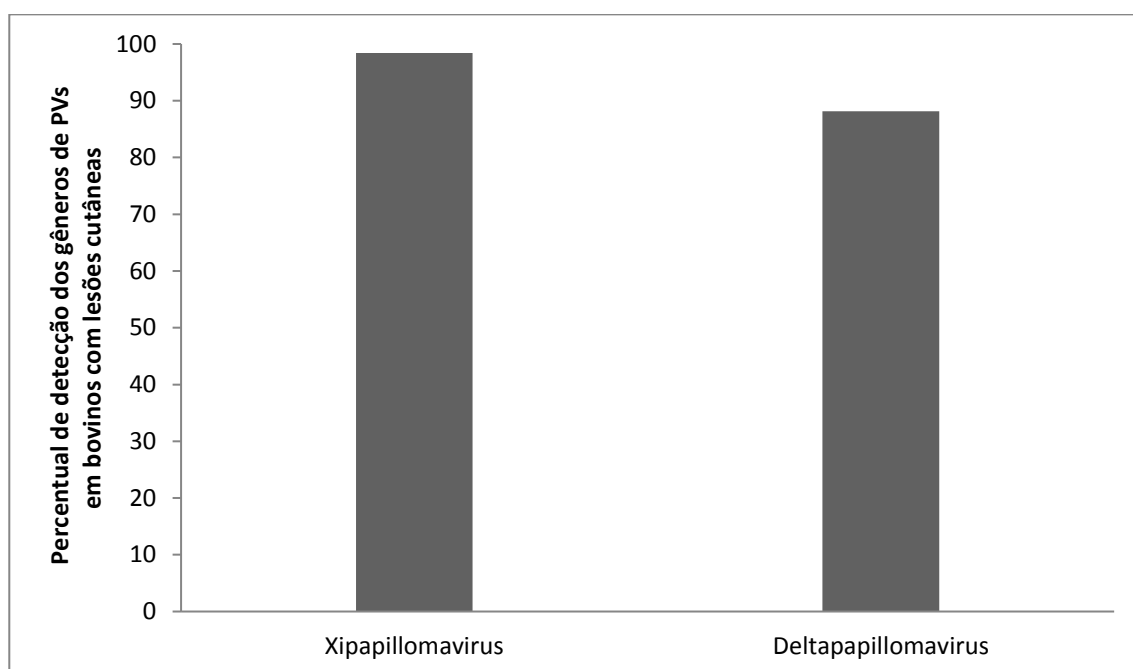


Figura 12: Gráfico representativo do percentual de BPV por agrupamento filogenético em amostras de sangue bovino.

5.1.3 Genotipagem amostras de lesão cutânea

Nas amostras oriundas de lesão cutânea dos animais, os tipos de BPVs encontrados por PCR tipo-específica foram os seguintes: BPV 2 e BPV 3 (100%, cada), BPV 11 (97,1%), BPV 6, BPV 10 e BPV 12 (94,2%), BPV 4 (82,8%), BPV 8 (65,7%), BPV 9 (31,4%) (figura 13). Os tipos BPV 1 e BPV 5 não foram detectados em nossa análise; os tipos BPV 7, BPV 13 e BPV 14 não foram avaliados.

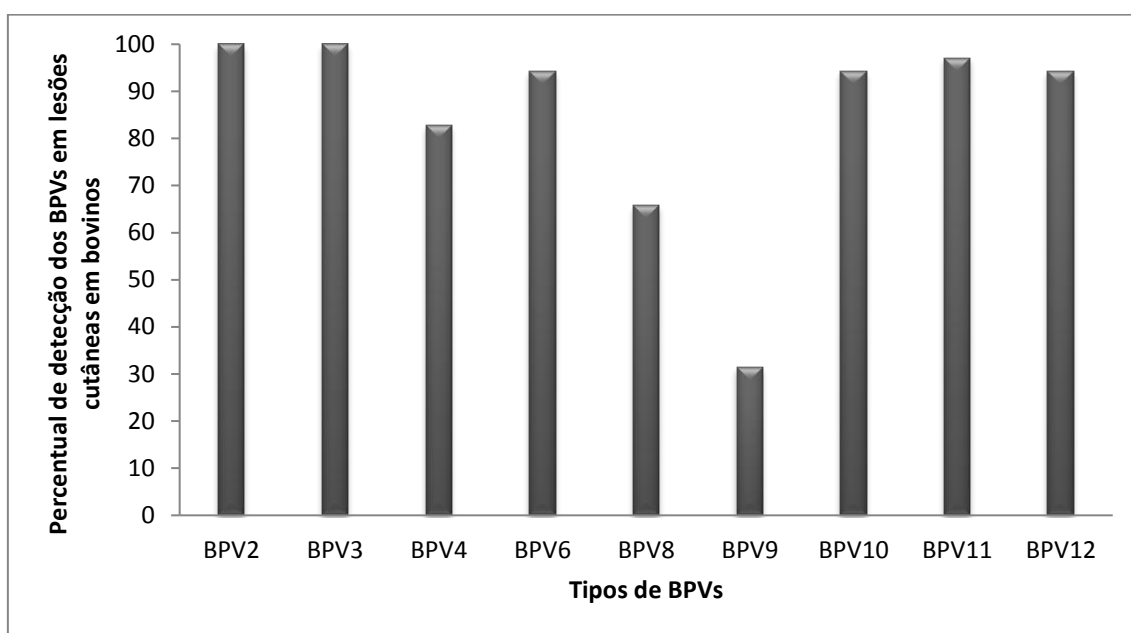


Figura 13: Distribuição dos tipos de BPVs detectados por PCR específica em lesões cutâneas em tecido bovino. No eixo Y, está representado o percentual de amostras e no eixo X os tipos de BPV (-2 a -4, -6, -8 a -12).

Os gêneros mais encontrados nas amostras oriundas de lesões cutâneas analisadas foram o *Xipapillomavirus*, com um percentual de 100%. Do mesmo modo, o gênero *Deltapapillomavirus* apresentou um percentual de 89%. O gênero *Epsilonpapillomavirus* apresentou um percentual de 71,42% (figura 14, tabela 2), e o gênero *Dyoxipapillomavirus* não foi incluído nas análises.

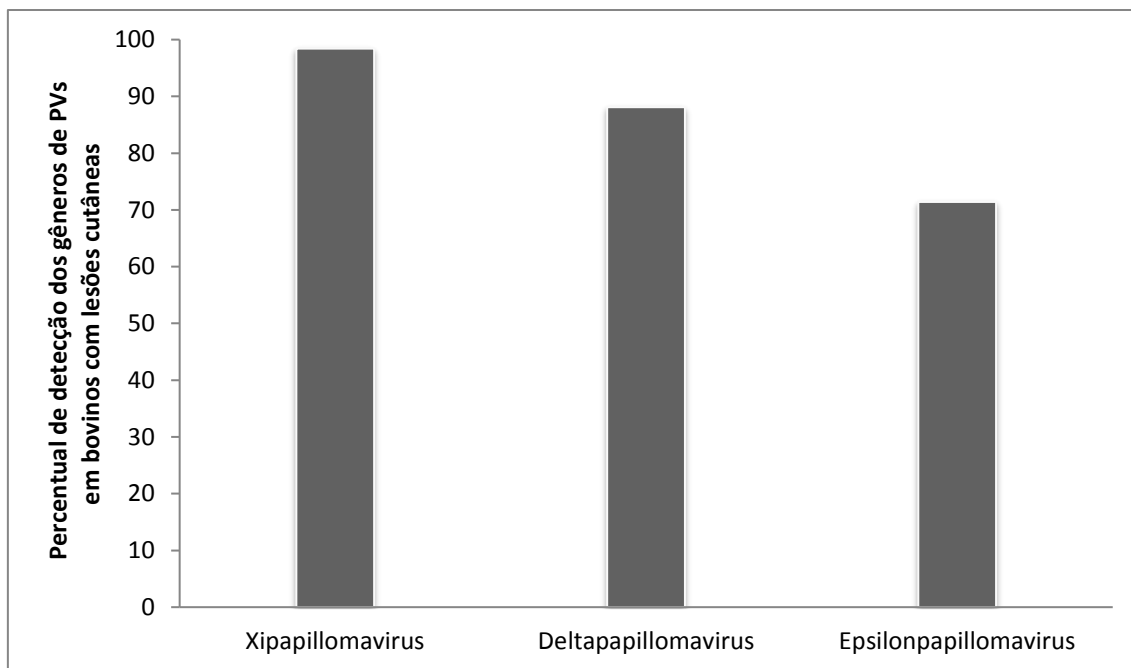


Figura 14: Gráfico representativo do percentual de BPV, por agrupamento filogenético, em amostras de lesões cutâneas.

5.2 Co-infecção entre os diversos tipos de BPVs

5.2.1 Co-infecção de BPVs em amostras de tecido sanguíneo

Nas análises com as amostras de sangue bovino foi observado um percentual de 99% das amostras positivas para dois ou mais tipos de BPVs (Figura 15). A co-infecção mais frequente em nosso estudo se apresentou com seis tipos diferentes de BPV (-1,-2,-9,-10,-12 e -14).

A co-infecção com cinco tipos diferentes de BPV foi a segunda mais frequente nas amostras de sangue bovino. Amostras de sangue bovino apresentando co-infecção com quatro tipos diferentes de BPVs foi o terceiro tipo mais predominante em nosso estudo.

A co-infecção em tecido sanguíneo de bovinos, apresentando dois e três tipos diferentes de BPV foi o quarto tipo mais comum totalizando 18 animais.

A co-infecção em tecido sanguíneo, apresentando sete tipos diferentes de BPVs foi encontrada em 17 bovinos. Apenas um animal apresentou nove tipos diferentes de BPVs em amostra de sangue bovino e apenas um dos animais apresentaram infecção em tecido sanguíneo bovino, por um único tipo de BPV.

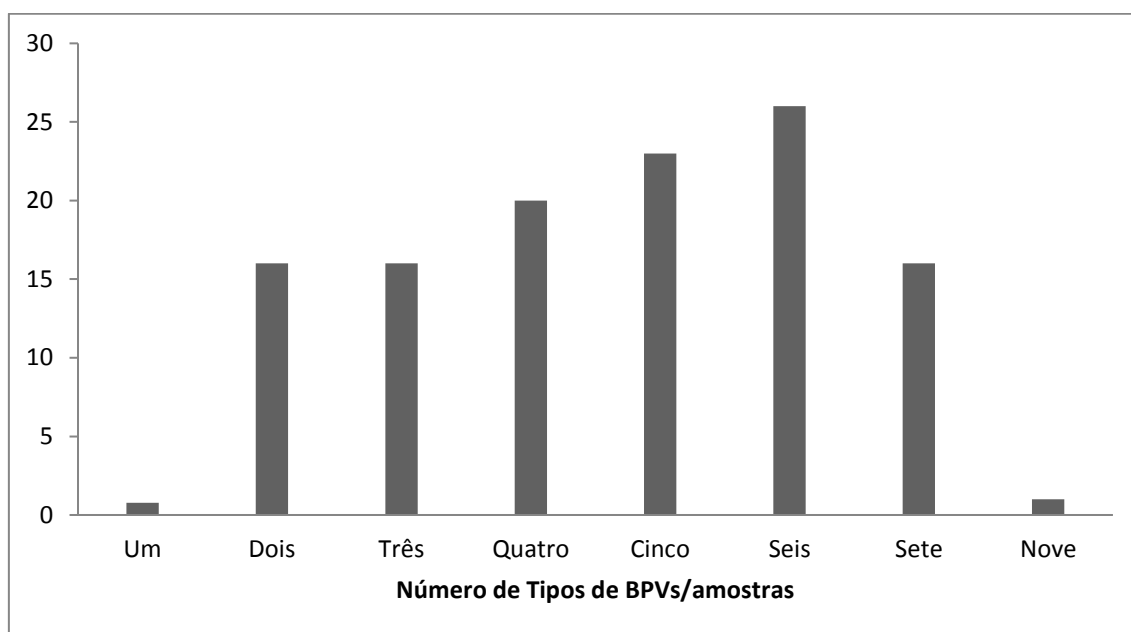


Figura 15: Gráfico representativo da quantidade de BPV por amostras em sangue bovino, variando de apenas um tipo por amostra a nove tipos por amostra. No eixo Y está representado o número total de amostras e no eixo X o número de tipos de BPVs por amostras de sangue bovino.

5.2.2 Co-infecção amostras de lesão cutânea

Nas análises com as amostras de lesão cutânea foram observadas um percentual de co-infecção em 100% das amostras, com cinco ou mais tipos de BPVs (Figura 16). A co-infecção mais frequente em nosso estudo se apresentou com oito tipos diferentes de BPV (-2,-3,-4,-6,-8,-10,-11 e -12).

A co-infecção com sete tipos diferentes de BPVs foi a segunda mais frequente. Amostras com seis tipos diferentes de BPVs foi o terceiro tipo mais predominante em nosso estudo.

A co-infecção com nove tipos diferentes de BPV foi a quarta mais comum com cinco animais. Apenas um animal apresentou cinco tipos diferentes de BPV.

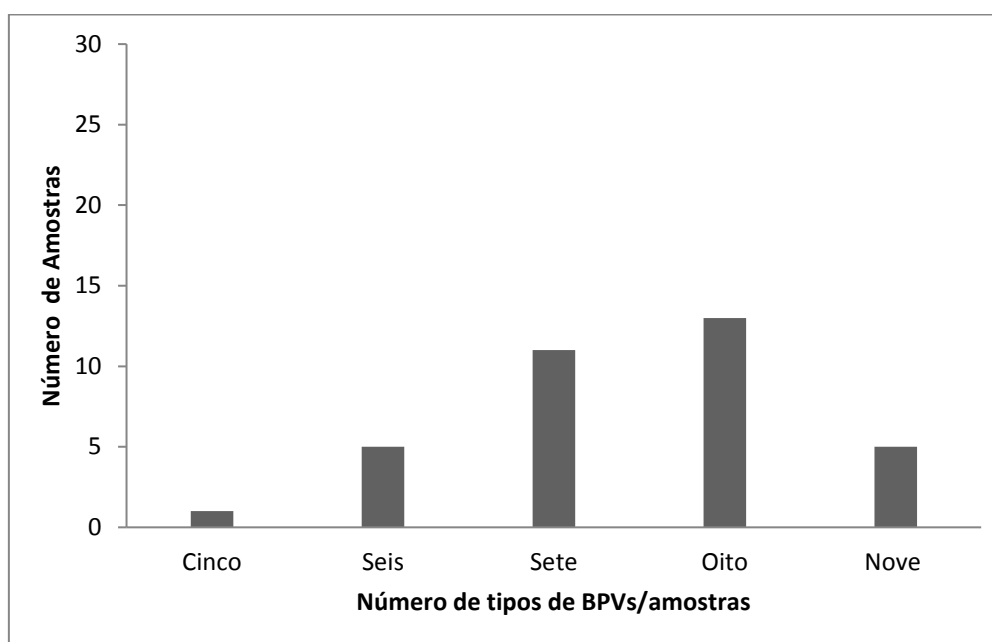


Figura 16: Gráfico representativo da quantidade de BPV por amostras em amostras de lesão cutânea em tecido bovino, variando de cinco tipos por amostra a nove tipos por amostra. No eixo Y está representado o percentual de amostras e no eixo X o número de tipos de BPVs por amostras de lesão cutânea em tecido bovino.

5.3 Genotipagem para o gene *MBL2*

Em relação a PCR específica para o exon 1 do gene *MBL2* realizadas nas amostras de tecido sanguíneo 93,58% foram positivas (175/187), apresentando amplicons com 247 pares de bases (Figura 17).

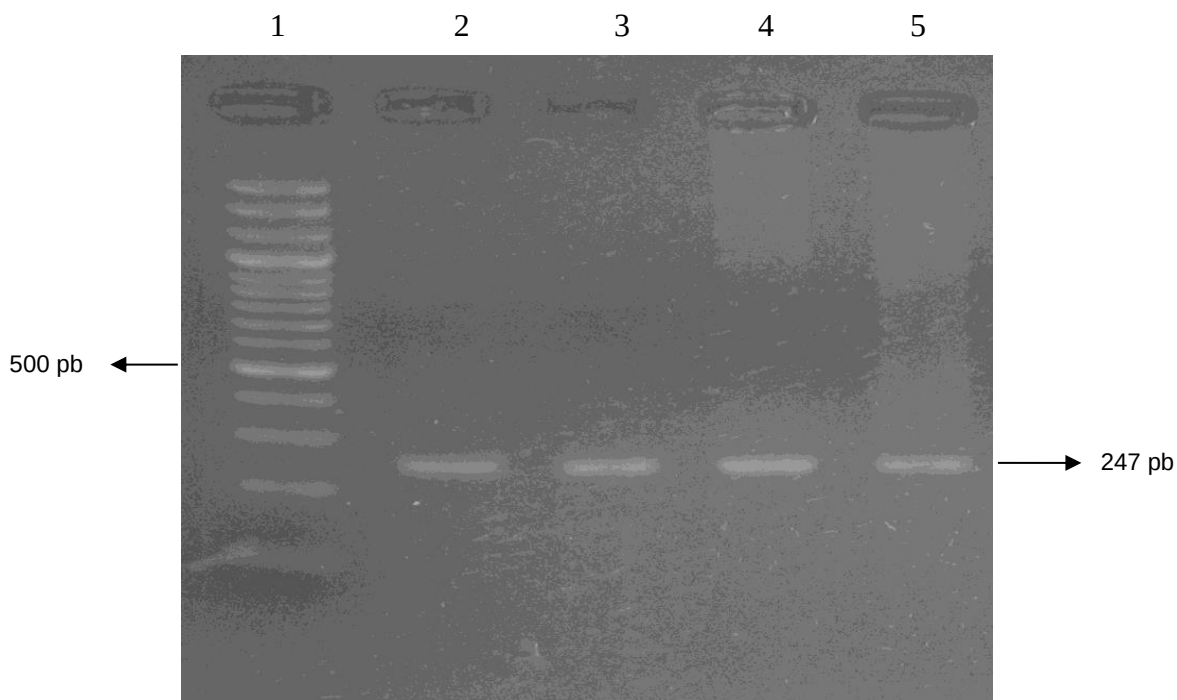


Figura 17 Gel representativo PCR – *MBL2* (exon 1), com fragmentos de 247 pb. Linhas: 1 marcador molecular de 100 pares de bases, linhas 2 a 5 amostras de sangue bovino.

As amostras de tecido sanguíneo positivas por PCR para o exon 1 do gene *MBL2* (175/187) foram sequenciadas e 167 amostras (167/175), apresentaram sequências com cromatogramas de boa qualidade e valores de Phred iguais ou superiores a 30, viabilizando a correta análise das sequências para posterior identificação de SNPs. As demais amostras que apresentaram valores de Phred inferiores a 30 foram descartadas das análises.

As análises das sequências do exon 1 de *MBL2* foram realizadas com o programa MEGA v. 5.3, onde foram detectados 245 sítios conservados e 02 sítios variáveis, sendo dois informativos. Os sítios informativos foram encontrados nas regiões 235 G/A e 244 T/C.

Em relação à avaliação das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs do exon 1 de *MBL2* e de sua possível associação com a presença de BPV não foi observada associação entre os SNPs 235 G/A e 244 T/C do exon 1 do gene *MBL2* e a suscetibilidade para infecções causadas por BPVs (quadro 2).

Os SNPs 235 G/A e 244 T/C do exon 1 do gene *MBL2* estavam em equilíbrio de Hardy Weinberg tanto para os bovinos com lesão ($p=0.837$; $X^2=0.041$) quanto para os bovinos sem lesão ($p=0.367$, $X^2=0.8112$).

	Com Lesão n=92 (%)	Sem Lesão n=75 (%)	p-value, OR [95% IC]
SNP1 (235 G/A)			
Alelos			
G	163 (88)	125 (83)	Referência
A	21 (12)	25 (17)	0.201, 0.645 [0.32 -1.26]
Genótipos			
GG	72 (78)	51 (68)	Referência
GA	19 (21)	23 (31)	0.15; 0.587 [0.27 -1.25]
AA	1 (1)	1 (1)	1; 0.71 [0.008 – 56.6]
SNP2 (244 T/C)			
Alelos			
T	163 (88)	125 (83)	Referência
C	21 (12)	25 (17)	0.201, 0.645 [0.32 -1.26]
Genótipos			
TT	72 (78)	51 (68)	Referência
TC	19 (21)	23 (31)	0.587, [0.27 -1.25]
CC	1 (1)	1 (1)	1; 0.71 [0.008 – 56.6]

Quadro 2: Análise realizada com o programa SNPstats contendo os SNPs, frequência, P-value, OR, IC – Intervalo de confiança, para o exon 1 do gene *MBL2*.

5.4 Genotipagem para o gene *TNF-alfa*

Em relação a PCR específica para a região promotora do gene *TNF-alfa* realizadas nas amostras de tecido sanguíneo, 51,33% das amostras foram positivas (96/187), apresentando amplicons de 639 pares de bases (figura 18).

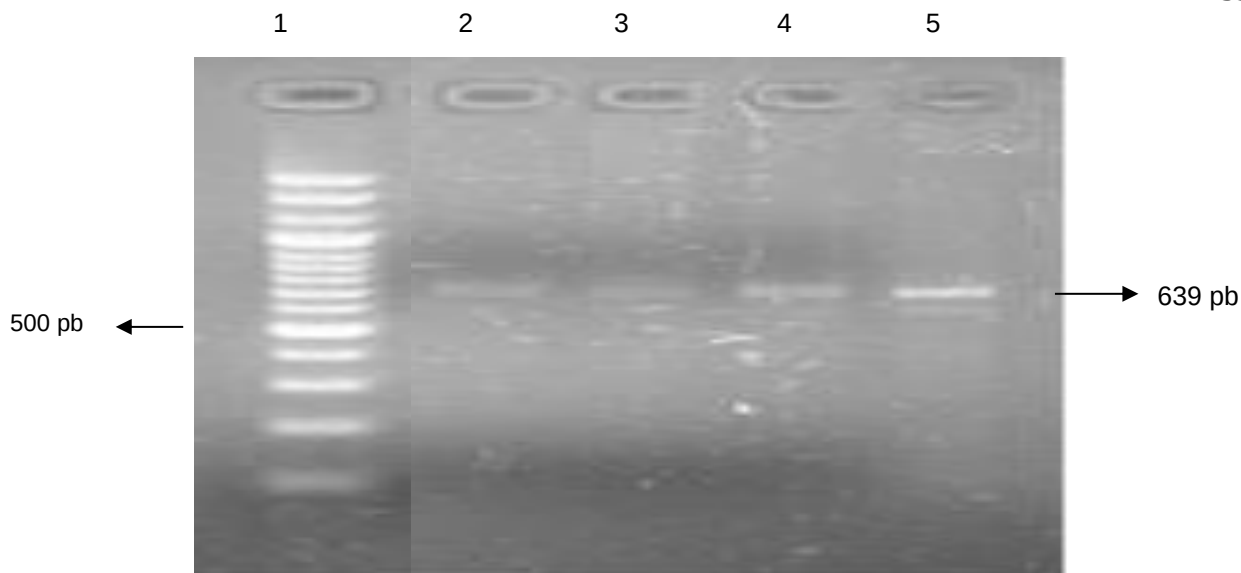


Figura 18: Gel representativo PCR – *TNF-alfa*, do fragmento de 639 pb contido a região promotora do gene (-1044 a -406). Linhas: 1 marcador molecular de 100 pares de bases, 2 – 5 amostras de sangue bovino.

As amostras de tecido sanguíneo positivas por PCR específica para a região promotora do gene *TNF-alfa*, (96/187) foram sequenciadas e 36 (36/96), apresentaram sequências com cromatogramas de boa qualidade e valores de Phred iguais ou superiores a 30, viabilizando a correta análise das sequências. As demais amostras que apresentaram valores de Phred inferiores a 30 foram eliminadas das análises.

As análises das sequências da região promotora do gene *TNF-alfa* (-1044 a -406) foram realizadas com o programa MEGA v. 5.3, onde foram detectados 638 sítios conservados e 1 sítio variável, sendo um informativo. O sítio informativo foi encontrado na região – 627 A/G.

Em relação à avaliação das frequências alélicas e genotípicas dos SNPs da região promotora do gene *TNF-alfa* (-1044 a -406), não foram observadas associações entre os SNPs do gene *TNF-alfa* e a susceptibilidade de infecção por BPV em bovinos (quadro 3).

O SNP -627 A/G da região promotora do gene *TNF-alfa* (-1044 a -406) está em equilíbrio de Hardy Weinberg para os bovinos com lesão com valores

de: $p=0.834$; $X^2= 0.043$ e estão em equilíbrio de Hardy e Weinberg para os bovinos sem lesão com valores de: $p= 0.782$, $X^2=0.076$.

	Com Lesão n=21 (%)	Sem Lesão n=15 (%)	p-value; OR [95% IC]
SNP (-627 A/G)			
Alelos			
A	22 (52)	16 (53)	Referência
G	20 (48)	14 (47)	1; 1.03 [0.36 – 2.95]
Genótipos			
AA	6 (29)	4 (27)	Referência
AG	10 (48)	8 (53)	1; 0.838 [0.12-5.11]
GG	5 (23)	3 (20)	1; 1.104 [0.11 – 11.5]

Quadro 3: Análise realizada com o programa SNPstats contendo os SNPs, frequência, P-value, OR, IC – Intervalo de confiança para a região promotora do gene *TNF-alfa*.

6. Discussão

Nesse estudo foram realizadas análises nas amostras de sangue de bovinos (com lesão e sem lesão) e em amostras oriundas de lesões cutâneas, para os diferentes tipos de BPVs, utilizando *primers* específicos para detecção, bem como análises de co-infecção e identificação de novos tipos circulantes. Foi analisada a associações dos SNPs em regiões específicas nos genes *MBL2* e *TNF-alfa* com o BPV.

Os tipos virais mais frequentes, encontrados em nosso estudo, nas amostras de sangue foram: BPV10, BPV12, BPV2 e BPV9. Resultado que difere do encontrado por Santos *et al.*, (2013) onde os tipos BPV1 e BPV2 foram os mais encontrados no sangue de bovinos, o mesmo ocorrido com os estudos de Diniz *et al.*, (2009).

Estudos com os BPV1 e BPV2 em amostras de sangue são os mais abordados por pesquisadores (Freitas *et al.*, 2003; Roperto *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013 a, b, c). Tornando necessários estudos mais amplos com a inclusão de todos os tipos virais em sítios não epiteliais, como o sangue.

Embora os papilomavírus sejam descritos como epiteliotrópicos, no entanto, o DNA de BPV foi detectado em diferentes sítios, como o sêmem (Silva *et al.*, 2011, 2013a), sangue periférico, leite, plasma e colostro (Stocco dos Santos *et al.*, 1998). O tecido sanguíneo foi identificado como propício a infecção para o BPV (Roperto *et al.*, 2011), podendo ser transportado para todo o corpo do animal e para tecidos não epiteliais (Freitas *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2013).

O BPV4 apresentou uma pequena quantidade de amostras positivas, em amostras de sangue nos bovinos analisados, resultados semelhantes com o encontrado na literatura (Santos *et al.*, 2013).

Os tipos BPV3 e BPV6 apresentaram uma baixa frequência em relação aos tipos mais encontrados nas amostras de sangue em bovinos em nosso estudo, diferentemente do encontrado por Santos *et al.* (2013) que em suas análises encontraram mais de 50% das amostras com os BPV3 e BPV6. A divergência entre os resultados pode ser explicada pela diferença nas populações estudadas, por Santos *et al.*, (2013) que são provenientes de várias fazendas do interior da Bahia, Brasil e os bovinos do nosso estudo são provenientes da Estação Experimental de Itambé, Pernambuco, Brasil.

Nas amostras de sangue analisadas em nosso estudo, não foram encontrados os tipos de BPV5, BPV8 e BPV13. Estes resultados diferem da literatura onde os papilomas bovinos têm sido diagnosticados em todo o mundo.

Santos *et al.* (2013) em suas análises verificaram a presença de BPV8 em amostras de sangue em bovinos do interior da Bahia, Brasil, e a ausência de BPV5 em suas amostras, o mesmo resultado encontrado em nosso estudo, o BPV13 não foi avaliado no referido estudo.

Em nosso estudo foi encontrado em quase todas as amostras (com exceção de uma) múltiplos tipos de BPVs com até nove genótipos diferentes de amostras de sangue de bovinos. Santos *et al.*, (2013) em seus estudos detectaram múltiplos tipos de BPVs em amostras de sangue, com cinco tipos de BPV por amostra. De acordo com Batista *et al.*, (2013), as co-infecções

podem ser uma consequência da imunossupressão, facilitando a existência de infecções persistentes em rebanhos bovinos.

Entretanto o BPV presente no sangue e associados com mais de um tipo de papilomavírus pode ser uma preocupação relacionada com a transmissão horizontal, onde um animal pode infectar outros por contato direto ou indireto (cercas, bebedouros, cordas, ordenhadeiras, moscas) (Campo, 1997; Stocco dos Santos *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 1999) e na transmissão vertical o animal com múltiplos tipos de BPV pode infectar, com maior facilidade, pela via transplacentária ou no parto a sua prole (Roperto *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011).

Populações confinadas são mais susceptíveis aos surtos, como os bovinos utilizados na pecuária leiteira, e dentre estes, os animais da raça holandesa, apresentam maior incidência da doença (Silva *et al.*, 2012). Dentre os fatores que podem estar relacionados com a papilomatose bovina, está a capacidade de obter uma resposta imune eficiente.

Os tipos virais mais encontrados nas lesões cutâneas foram: BPV2, BPV3, BPV4, BPV10, BPV11 e BPV12. Resultados semelhantes aos encontrados por Claus *et al.* (2007); Silva *et al.* (2012) Carvalho *et al.* (2012) com exceção dos novos tipos BPV11 e BPV12 que não foram testados.

Nas amostras de lesão cutânea não foram observados os tipos BPV1 e BPV5 o que difere da literatura (Carvalho *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012), onde os papilomas bovinos oriundo de lesões cutâneas tem sido diagnosticados em todo o mundo.

Ogawa *et al.* (2004) em seus estudos detectaram os tipos de BPV1, BPV3, BPV5 e BPV6 em amostras de papiloma. No Japão, onde foram

encontrados tumores benignos em tetas causados pelo BPV6 (Maeda *et al.*, 2007). Há relatos de casos de BPV em bovinos na Europa, América, Ásia e Oceania (Schmitt *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2011).

Em um estudo com bovinos na Alemanha foram encontrados os tipos de BPV (-1, -6, -8 e -10) em verrugas (Schmitt *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2011). Carvalho *et al.* (2012) detectaram nas populações do estado da Bahia, Brasil os tipos BPV5 e BPV8 em verrugas.

Alguns trabalhos descrevem a ocorrência de co-infecção com diferentes tipos de BPV em todo o mundo. No Japão, Ogawa *et al.* (2004) observaram a presença de BPV em até quatro tipos e supostos novos tipos de BPV no mesmo papiloma no rebanho japonês. No Brasil, a simultânea presença de BPV1 e BPV2 foi detectada em uma mesma lesão (Yagui *et al.*, 2006, 2008; Lindsey *et al.*, 2009).

Na literatura podemos observar que o tipo viral mais comum em lesões cutâneas ocorre com os tipos virais BPV1 e BPV2 (Freitas *et al.*, 2003, 2007; Carvalho *et al.*, 2012), por esse motivo o número de dados sobre esses tipos virais se apresentam com maior volume na literatura.

Existem relatos de cinco combinações diferentes de infecção múltipla por BPV em bovinos (Claus *et al.*, 2009). A co-infecção com BPV1 e BPV2 foi descrita na Índia (Leishangthem *et al.*, 2008; Pangty *et al.*, 2010). A co-infecção com BPV1 e BPV11 foi avaliada utilizando um ensaio de genotipagem multiplex BPV em bovinos na Alemanha (Schmitt *et al.*, 2010). No Brasil, utilizando *primers* específicos para os tipos de BPV, foi observada a co-infecção por vários tipos de BPVs em lesões cutâneas (Carvalho *et al.*, 2012).

Nas amostras de lesões cutâneas, pode se observar que todas as amostras estavam infectadas com o papiloma bovino. Todas as amostras apresentaram múltiplas infecções com no mínimo cinco tipos diferentes de BPV por animais. Cinco amostras apresentaram nove tipos diferentes de BPV, demonstrando um alto nível de infecção por BPV.

Em nossos estudos, podemos observar a presença em grande quantidade dos novos tipos de BPV (-11, -12 e -14) circulantes na Estação Experimental de Itambé - IPA, tanto em lesão cutânea como no tecido sanguíneo.

O BPV11 apresentou um alto número de amostras oriundas de lesão cutâneas, nas amostras de sangue não foram detectadas em grandes quantidades.

O BPV12 foi o tipo mais encontrado nas amostras analisadas no tecido sanguíneo e em lesões cutâneas.

O BPV13 não foi detectado em nenhuma das amostras de sangue, o que significa que outros estudos devem ser iniciados para a confirmação dessa informação.

O BPV14 foi detectado nas amostras de sangue em mais de 50% dos animais. Esse novo tipo viral foi descrito por Batista *et al.* (2013) BPV/UFPE04BR (GenBank accession number: JQ897975). As amostras do nosso estudo foram confirmadas por sequenciamento e apresentaram 98% de similaridade quando em comparação com as sequências depositadas no NCBI/BLAST.

As reações de PCRs para o exon 1 do gene *MBL2* e para a região promotora do gene *TNF-alfa*, apresentaram algumas amostras negativas, o que

pode ter ocorrido pela baixa concentração do DNA em algumas amostras. As amostras foram sequenciadas e analisadas pelo software BLAST apresentaram 99% de similaridade, quando comparadas com o banco de dados do NCBI, demonstrando a confiabilidade das reações de PCR.

Os dois SNPs encontrados em nosso estudo para o exon 1 do gene *MBL2*, estão de acordo com os descritos na literatura (Wang *et al.*, 2012). Porém nesse mesmo estudo citado, são descritos mais dois SNPs, que não foram encontrados em nosso trabalho, fato que pode ser explicado por diferenças nas populações estudadas, uma vez que os animais do nosso estudo provém do interior de Pernambuco, Brasil e os animais estudados por Wang *et al* (2012) são provenientes da China.

Nas nossas análises não foram encontradas associações com os SNPs do gene *MBL2* (exon1) e a papilomatose bovina.

Existem relatos na literatura que demonstraram uma associação entre a presença de variantes alélicas do gene *MBL2* e a ocorrência de imunodeficiência associada às infecções crônicas (Garred *et al.*, 1997; Turner, 1998; Turner e Hamvas, 2000).

Konnai *et al.* (2006), descreveram três SNPs relacionados com leucemia viral bovina na região promotora do gene *TNF-alfa*. Em nossos estudos conseguimos detectar um dos SNPs descritos por Konnai *et al.*, (2006), porém o número reduzido de amostras analisadas impede as inferências sobre as nossas amostras.

Polimorfismos na região promotora do gene *TNF-alfa* em humanos foram associados a diversas doenças, como o lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, hepatite B (Reich *et al.*, 2002; Roxo *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004). A

associação entre o polimorfismo do gene *TNF-alfa* e a susceptibilidade para *HTLV-I* tem sido relatada em seres humanos (Nishimura *et al.*, 2000). No entanto, uma ligação direta entre as citocinas e os seus polimorfismos genéticos receptores, incluindo o *TNF-alfa* e a susceptibilidade a doença não foi identificada em animais domésticos (Konnai *et al.*, 2006).

Estudos de associação como esses poderão contribuir para estratégias de melhoramento animal, que se destina a melhorar a resistência a doenças infecciosas.

7. Conclusões

1. Novos tipos de BPV (-11, -12 e -14) foram identificados na EEI, em lesões cutâneas e no tecido sanguíneo. Todos os animais avaliados na EEI apresentaram-se infectados por BPV, demonstrando alta infecção no rebanho estudado.
2. A co-infecção na EEI foi verificada em 99% das amostras sanguíneas avaliadas e demonstrou um elevado número de tipos virais por animal. Nas amostras de oriundas de lesões cutâneas 100% dos animais da EEI apresentaram múltiplas infecções.
3. Nos bovinos avaliados nesse estudo não foram encontradas associações com os SNPs dos genes *MBL2* (exon1) e a região promotora do gene *TNF-alfa* e a papilomatose bovina.

8. Referências bibliográficas

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (2000) Cellular and Molecular Immunology. W. B. Saunders Company.
- Andrews AH; Blowey RW; Boyd, H (2008) Medicina bovina: doenças e criação de bovinos. 2: 1080.
- Araújo NC, Bello DMA, Souza PRE, Cimões R (2009) Association of polymorphism MBL2 gene in type 2 diabetic patients with periodontitis: a preliminary study. Acta Stomatol Croat (43) 290-300.
- Batista VAM, Silva ARM, Pontes NE, Reis CM, Corteggio A, Castro SR, Borzacchiello G, Balbino QV and Freitas AC (2013) Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identifications of a putative new virus type in Brazilian cattle. Vet. J. 197:368–373.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K, Zur HH, De Villiers EM (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. Virology, 401: 70-79.
- Bemelmans MH (1996) Increased concentrations of tumour necrosis factor (TNF) and soluble TNF receptors in biliary obstruction in mice soluble TNF receptors as prognostic factors for mortality Gut 38:447-453.
- Blandizzi C, Gionchetti P, Armuzzi A, Caporali R, Chimenti S, Cimaz R, Cimino L, Lapadula G, Lionetti P, Marchesoni A, Marcellusi A, Mennini FS, Salvarani C, Girolomoni G (2014) Inter jour of imun Pharmac (5) 1-10.
- Bocaneti F, Altamura G, Corteggio A, Velescu E, Roperto F and Borzachiello G (2014) Bovine papillomavirus: New insights into an old disease Transbound Emerg Dis. Doi:10.1111/tbed.12222: 1-10
- Boniotto M, Braida L, Spanò A, Pirulli D, Baldas V, Trevisiol C (2002) Variant mannose-binding lectin alleles are associates with celiac disease. Immunog; (54)596-598.
- Borzacchiello G, Ambrosio V, Roperto S, Poggiali F, Tsirimonakis E, Venuti A, Campo MS, Roperto F (2003) Bovine papillomavirus type 4 in Oesophageal papillomas of cattle from the South Italy. J Comp Pathol.128:203-6.
- Borzacchiello G (2007). Bovine papillomavirus infections in animals. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* 673-679.
- Borzacchiello G and Roperto F (2008). Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. Vet. Res. 39:45.
- Borzacchiello G and Corteggio A (2009). Equine sarcoid: state of the art. Ippologia 20, 7–14.
- Bradley JR (2008) TNF-mediated inflammatory disease. J. Pathol 214(2) 149-60.
- Campo MS; Jarrett WF (1994) Vaccination against cutaneous and mucosal papillomavirus in cattle. Ciba Found Symp. Chichester 187:61-73.
- Campo MS (1997) Bovine papillomavirus and cancer. Vet J 154:175-188.
- 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? In: Campo, M.S. (ed), *Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond*, Caister Academic Press, Scotland 373-383.
- Capparelli R, Parlato M, Amoroso MG, Roperto S, Marabelli R, Roperto F, Iannelli D (2008) Mannose-binding lectin haplotypes influence *Brucella abortus* infection in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Immunogenetics* 60:157–165.
- Carvalho C, Freitas AC, Brunner O, Góes LGB, Cavalcante AY, Beçak W (2003) Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine female. *Braz J Microbiol.* 34(supl. 1):82-4.
- Carvalho CCR, Batista MVA, Silva MAR, Balbino VQ, Freitas AC (2012) Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and new BPV11 subtype in cattle. *Transbound Emerg Dis* 59(5):441-7.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl Acad Sci* 72(9) 3666-3670.
- Chang F (1990) Role of papillomaviruses. *J Clin Pathol* 43:269-276.
- Cigni A, Pileri PV, Faedda R, Gallo P, Sini A, Satta AE, Marras R, Carta E, Argiolas D, Rum I, Masala A (2014) Interleukin 1, Interleukin 6, Interleukin 10, and Tumor Necrosis Factor α in Active and Quiescent Systemic Lupus Erythematosus. *J Investig Med* 62(5):825–829.
- Claus MP, Vivian D, Lunardi M, Alfieri AF and Alfieri AA (2007). Análise filogenética de papilomavírus bovino associado com lesões cutâneas em rebanhos do Estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27(7): 314-318.
- 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.
- Clark MF, Baudouin SV (2006) A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. *Intensive Care Medicine.* 32:1706-1712.
- Crawford LV, Crawford LV. A comparative study of Polyoma and Papilloma viruses. *Viol.* 1963;21:258-63.
- Corrêa W M, Corrêa CNM (1992) papilomatoses in: *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. 2 ed. Ed. Médica e Científica Ltda: 709-713.
- Costa APP, Garcia AHC, Copreski B e Brunoni D (2007) Estudos de polimorfismos de DNA associados aos distúrbios do desenvolvimento. *Cad de Pós_Grad em Disturb do Desenvol* 7: 112-131.
- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Viol.* 324:17-27.
- Dean MM, Minchinton RM, Heatley S, Eisen DP (2005) Mannose binding lectin acute phase activity in patients with severe infection. *J Clin Immunol* 25: 346–352.
- Deshpande A, Nolan JP, White PS, Valdez YE, Hunt WC, Peyton CL, Wheeler CM (2005) Tnf- α promoter polymorphisms and susceptibility to human

- papillomavirus 16-associated cervical cancer. *J. Infect Dis.* 191(6): 969-976.
- Diniz N, Melo TC, Santos JF, Mori E, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Freitas AC, Becak W, Carvalho RF and 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.
- Departamento de Economia Rural do Estado do Paraná (2015) Análise da conjuntura agropecuária. Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/bovinocultura_leite_14_15.pdf. Acesso em 20.07.2016.
- Dommett RM, Klein N, Turner MW (2006) Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 68(3) 193-209.
- Duarte I, Santos A, Sousa H, Catarino R, Pinto D, Matos A (2005) G-308A TNF-alpha polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical câncer. *Biochem Biophys Res Commun.* 334(2): 588-592.
- Dulbecco R, Ginsberg HS (1979) Os vírus de tumores. In: Dulbecco, R., Ginsberg, H.S. (eds.) *Microbiologia de Davis: virologia* (2) 1679 -1716.
- Eisa MI, Kandeel A, El-Sawalhy AA, Abouel-Fetouh MS (2000) Some studies on bovine papilloma vírus infection in cattle with trials of its treatment. *Veterinary Medicine Journal Giza*, 48(1): 47-55.
- Fernandes AP, Gonçalves MA, Simões RT, Mendes-Junior CT, Duarte G, Donadi EA (2008) A pilot case-control association study of cytokine polymorphisms in Brazilian women presenting with HPV-related cervical lesions. *Eur J Obstet gynecol Reprod Biol.* 140(2):241-244.
- Fernandes JV, Araújo JMG, Fernandes TAAM (2013) Biology and natural history of human papillomavirus. *Open Access Journal of Clinical Trial.* 5:1-12.
- Fepagro, Boletim Técnico da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária/ FEPAGRO; Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio – Porto Alegre, 2011.
- Foz Filho RPP, Lucas R, Maiorka PC, Yoshino ML (2002) Retirada cirúrgica de fibropapiloma eqüino por meio de criocirurgia. In: V Congresso Brasileiro de Medicina e Anestesiologia Veterinária. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias* 9 (1): 282-283.
- Freitas AC, Carvalho C, Brunner O, Jr Birgel EH, Libera AMD, Benesi FJ, Becak W and Stocco dos Santos RC (2003) Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: 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.* 697-704.
- Freitas AC, Silva MAR, Jesus ALS, Mariz FC, Cordeiro MN, Albuquerque BMF and Batista MVA (2011) Recent insights into Bovine papillomavirus. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5:6004–6012.
- Frazer IH (2004) Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature Reviews-Immunology.* (4) 46-54.
- Garcia-Laorden MI, Sole-Violan J, Castro FR (2008) Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility,

- severity, and outcome of pneumonia in adults. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122(2) 368.e2–374.e2.
- Garred P, Madsen HO, Balslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J and Svejgaard A (1997) Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* 349 (9047):236-240.
- Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C (2003) Mannose-binding lectin deficiency revisited. *Mol Immunol.* 40: 73-84.
- Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO (2006) Mannose binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun.* 7:85–94.
- Gjerstorff M, Hansen S, Jensen B, Dueholm B, Horn P, Bendixen C, Holmskov U (2004) The genes encoding bovine SP-A, SP-D, MBL-A, conglutinin, CL-43 and CL-46 form a distinct collectin locus on *Bos taurus* chromosome 28 (BTA28) at position q.1.8–1.9. *Anim. Genet.* 35:333–337.
- Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliardo R, Haddad CFB, Kok PJR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE and Wheeler WC (2006) Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin Am Mus Nat Histor* 299: 1-262.
- Guidotti LG, Chisari FV (2000) Cytokine-mediated control of viral infections, *Virology* 273:221-227.
- Gulla KC, Gupta K, Krarup A, Gal P, Schwaeble WJ, Sim RB, O'Connor CD, Hajela K (2010) Activation of mannan-binding lectin-associated serine proteases leads to generation of a fibrin clot. *Immunology* (129) 482–495.
- Hartshorn KL, Sastry K, White MR, Anders EM, Super M, Ezekowitz RA (1993) Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. *J Clin Invest.* 91: 1414-1420.
- Hatama S (2012) Cutaneous Papillomatosis in Cattle. *JDR Vol 7-3* 319-323.
- Herbein G, O'Brien WA (2000) Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors in viral pathogenesis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223:241-257.
- Hajeer AH, Hutchinson IV (2001) Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol* 62(11) 1191-9.
- Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC (2003) Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu. Rev. Immunol.* 21:547–578.
- Igansi CN (2009) Associação entre polimorfismos de genes do Sistema imunológico (IL-10, TNF-alfa) e infecção por HPV nos diferentes graus de lesões cervicais. Tese doutorado UFRGS.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (2014) disponível em: http://ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20120358&taxa_name=Papillomaviridae. Acesso em: 04.05.2015.
- Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, Stuart LM (2009) Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev* 230, 9–21. 10.1111/j.1600-065X.2009.00789.x.
- Jelínek F, Tachezy R (2005) Cutaneous papillomatosis in cattle. *J Comp Pathol* 132:70-81.
- Juul-Madsen HR, Kjærup RM, Toft C, Henryon M, Heegaard PM, Berg P, Dalgaard TS (2011) Structural gene variants in the porcine mannose-binding lectin 1 (*MBL1*) gene are associated with low serum MBL-A concentrations. *Immunogenetics* 63:309–317.
- Kassiotis G, Kollias G (2001) Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55

- TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med* 193(4) 427-34.
- Kimura L (2010) Fatores genéticos associados à hipertensão essencial em populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira-SP. Tese (Doutorado) USP – São Paulo, SP, Brasil.
- Kilpatrick DC (1998) Phospholipid-binding activity of human mannan-binding lectin. *Immunol Lett* (61) 191–195.
- Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, Ohashi K and Onuma M (2006) Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. *Microbes infect.* 8:2163-2171.
- Lancaster WD, and Olson C (1982) Animal papillomaviruses. *Microbiol. Rev.* 46, 191–207.
- Larsen F, Madsen HO, Sim RB, Koch C, Garred P (2004) Disease associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein. *J. Biol. Chem.* 279:21302–21311.
- Leishangthem GD, Somvanshi R, Tiwari AK (2008) Detection of bovine papilloma-viruses in cutaneous warts/ papillomas in cattle. *Indian J. Vet. Pathol.* 32:15-20.
- Leto MGP, Santos-Júnior GF, Porro AM (2011) Tomimori J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol.* 86(2):306-17.
- Lendez PA, Passucci JA, Poli MA, Gutierrez SE, Dolcini GL, Ceriani MC (2015) Association of TNF-alfa gene promoter region polymorphisms in bovine leukemia virus (BLV)-infected cattle with different proviral loads. *Arch Virol* Doi 10.1007/s00705-015-2448-5.
- Lillie, BN, Brooks AS, Keirstead ND, Hayes MA (2005) Comparative genetics and innate immune functions of collagenous lectins in animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108:97–110.
- Lillie BN, Keirstead ND, Squires EJ, Hayes MA (2007) Gene polymorphisms associated with reduced hepatic expression of porcine mannan-binding lectin C. *Dev. Comp. Immunol.* 31:830–846.
- 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.
- Lin MT, Albertson TE (2004) Genomic polymorphisms in sepsis. *Critical Care Medicine.* 32:569-579.
- Lipscombe RJ, Sumiya M, Summerfield JA, Turner MW (1995) Distinct physicochemical characteristics of human mannose binding protein expressed by individuals of differing genotype. *Immunology* 85:660–667.
- Liu F, Liao Q, Liu Z (2006) Mannose-binding lectin and vulvovaginal candidiasis. *International Journal of Gynecology e Obstetrics* 92:43-47.
- Liu J, Ju Z, Li Q, Huang J, Li R, Li J, Ma L, Zhong J, Wang C (2011) Mannose-binding lectin 1 haplotypes influence serum MBL-A concentration, complement activity, and milk production traits in Chinese Holstein cattle. *Immunogenetics* 63:727–742.
- Liew FYC, Parkinson S, Millot A, Severn A, Carrier M (1990) Tumor necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. I. TNF-alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology* (69) 570-573.

- Longworth MS and Laiminis LA (2004) Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Review* 68: 362-372.
- Lu LP, Li XW, Liu Y, Sun GC, Wang XP, Zhu XL, Hu QY, Li H (2004) Association of -238 G/A polymorphism of tumor necrosis factor- α gene promoter region with outcomes of hepatitis B virus infection in Chinese Han population. *World J Gastroenterol* (10) 1810-1814.
- Lunardi M, Alfieri AA, Otonel RA, Alcantara BK, Rodrigues WB, Miranda AB and Alfieri AF (2012) Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet. Microbiol.* 162:207-213.
- Lunardi M, Tozato CC, Alfieri AF, Alcântara BK, Vilas-Boas LA, Otonel RAA, Headley SA, Alfieri AA (2016) Genetic diversity of bovine papillomavirus types, including two putative new types, in teat warts from dairy cattle herds. *Arch Virol* DOI 10.1007/s00705-016-2820-0
- Madsen HO, Garred P, Kurtzhals JA, Lamm LU, Ryder LP, Thiel S, Svejgaard A (1994) A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. *Immunogenetics* 40:37-44.
- Madsen HO, Satz ML, Høgh B, Svejgaard A, Garred P (1998) Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America. *J. Immunol.* 161:3169-3175.
- Maeda Y, Shibahara T, Wada Y, Kadota K, Kanno T, Uchida I, Hatama S (2007) An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. *Vet. Microbiol.* 121:242-248.
- Mayr A, Guerreiro MG (1988) *Virologia Veterinária* (3) 476p.
- Mancilha JC (2013) Papilomatose bovina. Uma doença, vários tratamentos. *Revista Mundo do Leite*, São Paulo, 62: 28-29.
- Marins RS de QS (2004) Epidemiologia da papilomatose cutânea bovina e avaliação da eficácia de diferentes tratamentos em micro-regiões dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Campos dos Goyatacazes-RJ. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goyatacazes.
- Melo CB and Leite RC (2003). Papilomatose Bovina. *Ciênc. Vet. Tróp.* 6(1):1-12.
- Megyeri P, Pabst KM, Pabst MJ (1995) Serine protease inhibitors block priming of monocytes for enhanced release of superoxide. *Immunology* 86(4) 629-35.
- Miller ME; Seals J; Kaye R; Levitsky LC (1968) A familial, plasma associated defect of phagocytosis. *Lancet* 60-63.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2015) Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: 14.07.2016.
- Monteiro VLC, Coelho MCOC, Caneiro AS, Silva RFAA, Teixeira MN, Wanderley AG, Wanderley EK, Franco ES (2008) Descrição clínica e histopatológica da papilomatose cutânea bovina (BPV). *Ciência Animal Brasileira*. 9(4):1079-88.

- Monticielo OA, Mucenic T, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA (2008) The role of mannose-binding lectin in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 27(4):413-9.
- Munday JS, Thomson N, Dunowska M, Knight CG, Laurie RE, Hills S (2015) Genomic Characterisation of the feline sarcoid-associated papillomavirus and proposed classification as *bos Taurus* papillomavirus type 14. *Veterinary Microbiology*. 0378-1135.
- Muro LFF, Botteira CRP, Piccinin A (2008) Papilomatose bovina. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*. 10.
- Murphy FA, Gibbs EP, Horzineck MC, Studdert MJ (1999) *Poxviridae*. *Veterinary Virology Academic Press*. 277-291.
- Murphy K (2010) *Imunobiologia de Janeway*. Artemd 7ed.
- Nascimento GA, Souza EVM, Campos-Ferreira DA, Arruda MS, Ekert MHF, Brunheska D, Lima-Filho JL (2012) Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. *Biosens Bioelectron*. 38(1):61-6.
- Nicholls PK; Stanley MA (2000) The immunology of animal papillomaviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.73, p.101-127.
- Nishimura H and Honjo T (2001) PD-1: An inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance. *Trends Immunol* (22)265-268.
- Ogawa T, Tomita Y, Okada M, Shinozaki K, Kubonoya H, Kaiho I, Shirasawa H (2004). Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J. Gen. Virol.*, 85:2191-2197.
- Oviedo-Boyso J, Valdez-Alarcon JJ, Cajero-Juarez M, Ochoa-Zarzosa A, Lopez-Meza JE, Bravo-Patinõ A, Baizabal-Aguirre VM (2007) Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *J. Infect*. 54:399–409.
- Palaniyar N, Nadesalingam J, Clark H, Shih MJ, Dodds AW, Reid KBM (2004) Nucleic acid is a novel ligand for innate immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin *J Biol Chem* (279) 32728–32736.
- 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.
- Parham P (2001) *O Sistema Imune*. Ed. Artmed, Porto Alegre, 372 p.
- Purmessur D, Walter BA, Roughley PJ, Laudier DM, Hecht AC and Iatridis J (2013) A role for TNF α in intervertebral disc degeneration: A non-recoverable catabolic shift. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 433:151-156.
- Rampias T, Sasaki C, Psyrri A (2013) Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncology*.
- Reich K, Mossner R, König IR, Westphal G, Ziegler A, Neumann C (2002) Promoter polymorphisms of the genes encoding tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β are associated with different subtypes of psoriasis characterized by early and late disease onset. *J Invest Dermatol* (118) 155-163.
- Romanos MTV, Santos NSO, Miranda MMF (2002) *Víroses Oncogênicas*. In: *Introdução à virologia humana* 199-219.
- Roperto S, Paolini F, Urraro C, Russo V, Borzacchiello G, Raso C, Rizzo C, Roperto F and Venuti A (2008) Detection of bovine papillomavirus type 2

- in peripheral blood of cattle urinary bladder tumours: possible biological role. *J. Gen. Virol.* 89:3027–3033.
- Roberto S, Comazzi S, Paolini F, Borzacchiello G, Esposito I, Russo V, Urraro C, Venuti A and Roberto F (2011) Peripheral blood mononuclear cells are additional sites of productive infection of bovine papillomavirus type 2. *J. Gen. Virol.* 92:1787–1794.
- Roos A, Garred P, Wildenberg ME, Lynch NJ, Munoz JR, Zuiverloon TC, Bouwman LH, Schlagwein N, Fallaux van den Houten FC, Faber-Krol MC, Madsen HO, Schwaeble WJ, Matsushita M, Fujita T, Daha MR (2004) Antibody-mediated activation of the classical pathway of complement may compensate for mannose-binding lectin deficiency. *Eur. J. Immunol.* 34:2589–2598.
- Roxo VM, Pereira NF, Pavoni DP, Lin MT, Hansen JA, De O Poersch C, Filho AM and Petzl-Erler ML (2003) Polymorphisms within the tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha genes and endemic pemphigus foliaceus - are there any associations? *Tissue Antigens* (62) 394-400.
- Russell PH, Edington N (1985) *Veterinary viruses* 265 p.
- Santos NOS, Romanos MTV, Wigg MD (2002) Diagnóstico Laboratorial das viroses. In: *Introdução à virologia humana* 25-46.
- Santos EUD, Silva MAR, Pontes NE, Coutinho LCA, Paiva SSL, Castro RS and Freitas AC (2013) Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of Cattle DOI:10.1111/tbed.12237
- Sandrin-Garcia P, Brandao LA (2010) Mannose binding lectin gene (MBL2) functional polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in southern Brazilians. *Hum Immunol.* (72) 516–521.
- Santin API (2001) Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos e caracterização anatomopatológica. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- 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*, 170:67-72.
- Schlapbach LJ, Mattmann M, Thiel S (2010) Differential role of the lectin pathway of complement activation in susceptibility to neonatal sepsis *Clinical Infectious Diseases* 51(2) 153–162.
- 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*). *Anim. Reprod. Sci.* 129(3-4):146-151.
- Silva MAR, Carvalho CCR, Coutinho LCA, Reis MC, de Aragão Batista MV, de Castro RS, dos Anjos FBR and Freitas AC (2012) Co-infection of Bovine Papillomavirus and Feline-Associated Papillomavirus in bovine cutaneous warts. *Transbound. Emerg. Dis.* 59:539–543.
- Silva MAR, Altamura G, Corteggio A, Roberto F, Bocaneti F, Velescu E, Freitas AC, Carvalho CCR, Cavalcanti KPS and Borzacchiello G (2013a) Expression of connexin 26 and bovine papillomavirus E5 in cutaneous fibropapillomas of cattle. *Vet. J.* 195:337–343.
- Silva MAR, Silva KMG, Jesus ALS, Barros LO, Corteggio A, Altamura G, Borzacchiello G and Freitas AC (2013b) The presence and gene expression of Bovine papillomavirus in the peripheral blood and semen of healthy horses. *Transbound. Emerg. Dis.* 61(4)329-333.

- Silva MAR, De Albuquerque BMF, Pontes NE, Coutinho LCA, Leitão MCG, Reis MC, Castro RS and Freitas AC (2013c) Detection and expression of Bovine papilloma virus in blood of healthy and papillomatosis-affected cattle. *Genet. Mol. Res.* 12:3150–3156.
- Silva LAF; VERÍSSIMO ACC; VIANA FILHO PRL; FIORAVANTI MCS (2004) Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamentos para papilomatose bovina. *Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia*, v11,1:153-165.
- Solé X, Guino E, Valls J, Iñiesta R and Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22: 1928–1929.
- Souto R, Falhari JPB, Cruz AD (2005) O Papilomavírus humano: Um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Revista brasileira de Cancerologia* 51: 155-160.
- Souza MBR and Oliveira JRM (2012) Searching for New Genetic Variations in Expression Databases for the GABAergic and Glutamatergic Systems 48: 257-264.
- Shope RE, Hurst EW (1933) Infectious papillomatosis of rabbits. *J Exp Med.* 58(5):607-24.
- Suffredini AF, Chanock SJ (2006) Genetic variation and the assessment of risk in septic patients. *Intensive Care Medicine.* 32:1679-1680.
- Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW, Summerfield JA (1991) Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 337:1569–1570.
- Staden R, Beal KF and Bonfield JK (2000) The Staden package 1998. *Methods molecular biology* 132: 115-130.
- Stringfellow DA *et al.*, (1988) *Virology*. Michigan Upjohn 139.
- Stocco dos Santos RC, Lindsey CJ, Ferraz O, Pinto JR, Miranda RS, Benesi FJ, Birgel EH, Bragança PCA and Beçak W (1998) bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: a experimental model. *Journal of General Virology* 79:2127-2135.
- Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Muraki Y, Goto D, Matsumoto I, Wakamiya N, Sumida T (2005) Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 64:311–314.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S (2011) “MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.”. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Teixeira HC, Abramo C, Munk ME (2007) Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. *Jornal Brasileiro Pneumologia.* 33(3):323-334.
- Thiel S, Gadjeva M (2009) Humoral pattern recognition molecules: mannan-binding lectin and ficolins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 653:58–73.
- Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW (1996) Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet.* 348: 1417-1419.
- Togbe D, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Doz E, Noulin N, Janot L, Secher T, Gasse P, Lima C, Coelho FR, Vasseur V, Erard F, Ryffel B, Couillin I,

- Moser R (2007) Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. *Int J Exp Pathol* (88) 387-391.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP (2008) Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117(2) 244-79.
- Tsutsumi A, Ikegami H, Takahashi R (2003) Mannose binding lectin gene polymorphism in patients with type I diabetes. *Hum Immunol* (64)621–624.
- Tulamo R, Frosen J, Junnikkala S, Paetau A, Kangasniemi M, Pelaez J, Hernesniemi J, Niemela M, Meri S (2010). Complement system becomes activated by the classical pathway in intracranial aneurysm walls. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology (90) 168-179.
- Tuner MW (1996) Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today*. (17): 532-540.
- Turner MW (1998) Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *Immunol* 199: 327-339.
- Turner MW and Hamvas RM (2000) Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associated Reviews in Immunogenetics 2: 305-322.
- Turk N, Zupancić Z, Starisina V, Kovac S, Babic T, Kriszinger M, Curic S, Barbic L, Milas Z (2005) Severe bovine papillomatosis: detection of bovine papillomavirus in tumor tissue and efficacy of treatment using autogenous vaccine and paraimmunity inducer. *Veterinarski Arch* 5(5):391-7.
- Wadhwa DR; Prasad B; Rao VN; Singh M (1995) Efficacy of auto-immunization in bovine cutaneous papillomatosis. *Indian Veterinary Journal* (71) 971-972.
- Walport MJ (2001) Complement. *N. Engl. J. Med.* 344:1140–1144.
- Wang X, Ju Z, Huang J, Hou M, Zhou L, Qi C, Zhang Y, Gao Q, Pan Q, Li G, Zhong J and Wang C (2012) The relationship between the variants of the bovine MBL2 gene and milk production traits, mastitis, serum MBL-C levels and complement activity. *Vet. Immunol. Immunop.* 148:311-319.
- White EA, Howley PM (2013) Proteomic approaches to the study of papillomavirus-host interactions. *Virology* 453:57-69.
- Worthley DL; Bardy PG (2005) Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. *Intern* 35(9) 548-55.
- Wosiacki SR, Reis ACF, Alfieri AF and Alfieri AA (2002) papillomavirus bovino tipo 2 na etiologia da hematúria enzoótica bovina. *Semina: Ciências Agrárias* 23(1): 121-130.
- 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 Virol Meth*, 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.* 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.

- Zheng ZM, Baker CC (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006;11:2286-302.
- Zhao F, Zhao Z, Yan G, Wang D, Ban Q, Yu P, Zhang W and Luo Y (2011) Polymorphisms in mannose-binding lectin (MBL) gene and their association with MBL protein levels in serum in the Hu sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140:297–302.
- Zhao ZL, Wang CF, Li QL, Ju ZH, Huang JM, Li JB, Zhong JF and Zhang JB (2012) Novel SNPs of the mannan-binding lectin 2 gene and their association with production traits in Chinese Holsteins. *Genet. Mol. Res.* 11 (4):3744-3754.
- Zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from Basic Studies to Clinical Application. *Nature reviews.* 2: 342-350.

9. Anexos

Tabela 1: Relação de amostras de sangue bovino, com a numeração do LEMTE, tipos de BPV, quantidade de BPVs por amostra, presença ou ausência de lesões (grupo 1= com lesão, grupo 2= sem lesão) e o agrupamento filogenético. Legenda: LEMTE – Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, BPV – Papilomavírus bovino, * amostra 94 foi descartada do estudo..

Número LEMTE	Tipos de BPVs	Quantidade de BPVs por amostra	Grupo	Agrupamento filogenético
1	2,9,10,12	4	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
2	2,4,6,9,10,12	6	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
3	2,6,9,10,12	5	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
4	2,9,10,12	4	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
5	2,9,10,12	4	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
6	2,9,10,12	4	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
7	2,9,10,12	4	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
8	1,2,9,10,12	5	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
9	1,2,9,10,12	5	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
10	1,2,4,9,10,12	6	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
11	1,2,6,9,10,12	6	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
12	1,2,6,9,10,12	6	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
13	1,2,6,9,10,11,12	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
14	1,2,6,9,10,11,12	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
15	1,2,6,9,10,11,12	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
16	1,2,9,10,11,12,14	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
17	1,2,4,9,10,12,14	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
18	1,2,9,10,11,12,14	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
19	1,2,9,10,12,14	6	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
20	1,2,9,10,11,12,14	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
21	1,2,9,10,12,14	6	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>

22	1,2,9,10,12,14	6	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
23	1,2,10,12,14	5	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
24	1,2,9,10,12,14	6	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
25	1,2,9,10,11,12,14	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
26	1,2,9,10,11,12,14	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
27	1,2,9,10,11,12,14	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
28	1,2,9,10,11,12,14	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
29	1,2,4,6,9,10,11,12,14	9	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
30	1,2,9,10,11,12,14	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
31	2,3,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
32	2,9,10,12,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
33	1,2,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
34	1,2,9,10,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
35	1,2,4,9,10,12,14	7	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
36	2,9,10,12,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
37	1,2,9,10,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
38	1,2,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
39	1,2,9,10,11,12,14	7	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
40	1,2,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
41	1,2,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
42	1,2,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
43	1,2,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
44	1,2,4,9,10,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
45	1,2,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
46	1,2,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
47	1,2,9,10,11,12,14	7	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
48	2,9,10,12,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
49	1,2,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
50	1,2,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
51	2,9,10,12,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>

52	2,9,10,12,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
53	2,9,10,12,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
54	2,9,10,12,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
55	1,2,4,9,10,12,14	7	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
56	1,2,9,10,12	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
57	1,2,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
58	2,9,10,12,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
59	1,2,9,10,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
60	1,9,10,11,12,14	6	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
61	1,9,12	3	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
62	1,2,9,10,12	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
63	2,9,10,12,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
64	10,12,14	3	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
65	2,10,12,14	4	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
66	1,2,9,10,12	5	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
67	1,2	2	2	<i>Deltapapillomavirus</i>
68	1,2,9,10,12	5	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
69	1,9,10,12	4	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
70	1,2,10,12	4	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
71	2,10,12	3	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
72	1,2,10,14	4	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
73	10,12	2	1	<i>Xipapillomavirus</i>
74	1,9,10,12	4	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
75	2,9,10,12,14	5	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
76	2,9,10,12,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
77	2,9,10,11,12,14	6	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
78	2,9,10,12	4	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
79	2,9,10,12	4	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
80	1,2,9,10,12,14	6	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
81	1,9,10,12,14	5	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>

82	1,2,9,10,12,14	6	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
83	1,2,9,10,12,14	6	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
84	10,14	2	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
85	1,2,10,12,14	5	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
86	9,10,12,14	4	2	<i>Xipapillomavirus</i>
87	2,9,10,11	4	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
88	1,2,9,10,11,12,14	7	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
89	9,10,12	3	2	<i>Xipapillomavirus</i>
90	2,3,11,12	4	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
91	2,12	2	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
92	2,12,14	3	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
93	11,12	2	1	<i>Xipapillomavirus</i>
94	Descarte*	--	--	-----
95	2,11,12	3	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
96	11,12	2	1	<i>Xipapillomavirus</i>
97	2,11, 14	3	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
98	2,12	2	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
99	2,12, 14	3	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
100	2,12	2	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
101	2,11,12	3	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
102	2,11,12	3	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
103	2,12	2	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
104	2,12	2	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
105	2,12	2	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
106	11,12	2	1	<i>Xipapillomavirus</i>
107	2,6,11,12	4	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
108	2,11,12	3	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
109	2,6,11,12,14	5	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
110	6,12	2	1	<i>Xipapillomavirus</i>
111	3,6,11,12	4	1	<i>Xipapillomavirus</i>

112	2,11,12	3	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
113	2,11,12	3	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
114	11,12,14	3	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
115	12	1	1	<i>Xipapillomavirus</i>
116	11,12	2	1	<i>Xipapillomavirus</i>
117	2,6,11,12	4	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
118	11,12	2	2	<i>Xipapillomavirus</i>
119	11,12	2	2	<i>Xipapillomavirus</i>
120	6,11,12,14	4	2	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
121	6,11,12	3	2	<i>Xipapillomavirus</i>
122	2,10,12	3	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
123	2,11,12	3	1	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
124	11,12	2	1	<i>Xipapillomavirus</i>
125	6,11,12	3	1	<i>Xipapillomavirus</i>
126	11,12	2	1	<i>Xipapillomavirus</i>
127	2,3,11,12	4	1	<i>Xipapillomavirus</i>

Tabela 2: Relação de amostras de lesão cutânea, com a numeração do LEMTE, tipos de BPV, quantidade de BPVs por amostra, e o agrupamento filogenético. LEMTE – Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, BPV – Papilomavírus bovino

Numeração	Localização da lesão	Tipos de BPV	Quantidade de BPV por amostra	Agrupamento filogenético
G47	Orelha	2,3,8,10,11,12	6	<i>Deltapapillomavirus,</i> <i>Xipapillomavirus,</i> <i>Epsilonpapillomavirus</i>
	Olho	2,3,8,10,11,12	6	<i>Deltapapillomavirus,</i> <i>Xipapillomavirus,</i> <i>Epsilonpapillomavirus</i>
	Pescoço	2,3,8,10,11,12	6	<i>Deltapapillomavirus,</i> <i>Xipapillomavirus,</i> <i>Epsilonpapillomavirus</i>
G41	Cabeça	2,3,4,8,9,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus,</i> <i>Xipapillomavirus,</i> <i>Epsilonpapillomavirus</i>
	Pescoço	2,3,4,6,8,9,10,11,12	9	<i>Deltapapillomavirus,</i> <i>Xipapillomavirus,</i> <i>Epsilonpapillomavirus</i>
	Membro	2,3,8,10,11,12	6	<i>Deltapapillomavirus,</i> <i>Xipapillomavirus,</i> <i>Epsilonpapillomavirus</i>
G58	Pescoço	2,3,4,8,9,10	6	<i>Deltapapillomavirus,</i> <i>Xipapillomavirus,</i> <i>Epsilonpapillomavirus</i>
	Cabeça	2,3,4,6,8,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus,</i> <i>Xipapillomavirus,</i> <i>Epsilonpapillomavirus</i>

8937K	Cernelha	2,3,4,6,8,9,10,11,12	9	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus, Epsilonpapillomavirus</i>
	Teto	2,3,4,6,8,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus, Epsilonpapillomavirus</i>
	Cabeça	2,3,4,6,10,11,12	7	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
8941K	Barbela	2,3,4,6,10,11,12	7	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
8939K	Teto	2,3,4,6,10,11,12	7	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
8938K	Cernelha	2,3,4,6,9,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
	Teto	2,3,4,6,8,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus, Epsilonpapillomavirus</i>
	Cauda	2,3,4,6,10,11,12	7	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
8936K	Costela	2,3,4,6,8,10,11	7	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus, Epsilonpapillomavirus</i>
	Barbela	2,3,4,6,10,11,12	7	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus</i>
	Teto	2,3,4,6,8,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus, Epsilonpapillomavirus</i>
	Cabeça	2,3,4,8,9,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus,</i>

1889E	Teto	2,3,4,6,8,9,10,11,12	9	<i>Epsilonpapillomavirus</i> <i>Deltapapillomavirus</i> , <i>Xipapillomavirus</i> , <i>Epsilonpapillomavirus</i>
8931K	Teto	2,3,6,8,9,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus</i> , <i>Xipapillomavirus</i> , <i>Epsilonpapillomavirus</i>
8942K	Costela	2,3,4,6,8,9,10,11,12	9	<i>Deltapapillomavirus</i> , <i>Xipapillomavirus</i> , <i>Epsilonpapillomavirus</i>
	Barbela	2,3,4,6,8,9,10,11,12	9	<i>Deltapapillomavirus</i> , <i>Xipapillomavirus</i> , <i>Epsilonpapillomavirus</i>
	Teto	2,3,4,6,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus</i> , <i>Xipapillomavirus</i>
8932K	Escápula	2,3,4,6,8,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus</i> , <i>Xipapillomavirus</i> , <i>Epsilonpapillomavirus</i>
	Teto	2,3,4,6,8,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus</i> , <i>Xipapillomavirus</i> , <i>Epsilonpapillomavirus</i>
	Barbela	2,3,4,6,9,10,11	7	<i>Deltapapillomavirus</i> , <i>Xipapillomavirus</i>
8935K	Cernelha	2,3,4,6,8,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus</i> , <i>Xipapillomavirus</i> , <i>Epsilonpapillomavirus</i>
	Linha Alba	2,3,4,6,10,11,12	7	<i>Deltapapillomavirus</i> , <i>Xipapillomavirus</i>
	Teto	2,3,4,6,8,10,11,12	8	<i>Deltapapillomavirus</i> , <i>Xipapillomavirus</i> ,

1236C	Teto	2,3,4,6,8,10,11,12	8	<i>Epsilonpapillomavirus</i>
				<i>Deltapapillomavirus,</i> <i>Xipapillomavirus,</i> <i>Epsilonpapillomavirus</i>
8933K	Prega Umbilical	2,3,4,6,10,11,12	7	<i>Deltapapillomavirus,</i> <i>Xipapillomavirus</i>
	Escápula	2,3,4,6,8,11,12	7	<i>Deltapapillomavirus,</i> <i>Xipapillomavirus,</i> <i>Epsilonpapillomavirus</i>
E31	Teto	2,3,6,11,12	5	<i>Deltapapillomavirus,</i> <i>Xipapillomavirus</i>

Artigo I

Análise da presença de co-infecções em bovinos infectados por papilomatose bovina e identificação de novos tipos circulantes em uma fazenda do estado de Pernambuco, Brasil

Análise da presença de co-infecções em bovinos infectados por papilomatose bovina e identificação de novos tipos circulantes em uma fazenda do estado de Pernambuco, Brasil

M. E. Junior-Pessoa¹, P.G. Carrazzoni², F. Tenorio-Filho², N.E. Pontes¹, M.A.R. da Silva³, A.P.D. Gurgel¹, A.C. de Freitas¹

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

² Instituto Agronômico de Pernambuco, Recife, Brasil.

³ Instituto Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

Resumo

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo com cerca de 200 milhões de cabeças. Alguns fatores como as doenças infecto-contagiosas ameaçam a produtividade nacional, dentre estas, a papilomatose. A papilomatose é causada pelo *Papillomavirus Bovino* (BPV), que é caracterizada por lesões hiperplásicas, que ocorrem na pele e mucosas. O objetivo deste trabalho é caracterizar os bovinos quanto à infecção por BPV e analisar a presença de co-infecções em tecido sanguíneo e lesões cutâneas. Em nosso estudo foram avaliados 127 bovinos da raça Girolando 5/8. Os tipos de BPV mais encontrados nas amostras de sangue foram: BPV 10 (97,75%), BPV 12 (92,13%), BPV 2 e BPV 9 (88,76%). Os tipos de BPV mais encontrados nas lesões foram: BPV 2 e BPV 3 (100%), BPV 11 (97,1%), BPV 10 (94,2%), BPV 12 (91,42%), BPV 4 (82,85%) e BPV 6 (80,0 %). A co-infecção foi detectada em 99% das amostras de sangue, nas amostras de lesões foi constatado a co-infecção em 100% das amostras. Todos os animais avaliados apresentaram-se infectados por BPV, demonstrando alta infecção no rebanho estudado e um elevado número de tipos virais por animal.

Introdução

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo com cerca de 200 milhões de cabeças (MAPA, 2015), distribuído em gado de corte e de leite. Alguns fatores como as doenças infecto-contagiosas ameaçam a produtividade nacional. Entre estas, a papilomatose ocorre em todo território nacional, apresenta alta incidência que pode chegar a 30% do rebanho em algumas propriedades, provocando prejuízos aos criadores (Freitas *et al.*, 2011).

A papilomatose é causada pelo *Papillomavirus Bovino* (BPV). BPVs são vírus oncogênicos, não envelopados, com morfologia icosaédrica e diâmetro de 52-55 nm. O capsídeo apresenta 72 capsômeros (60 hexaméricos e 12 pentaméricos) e o ácido nucléico é composto por DNA de fita dupla circular com massa molecular de $5,0 \times 10^6$ daltons e cerca de 8 kb (Stringfellow *et al.*, 1988). O genoma do BPV contém segmentos cada um constituído por uma série de regiões ou ORFs que codificam as proteínas virais.

Atualmente, existem 14 tipos de BPV (BPV -1 a -14) descritos na literatura, *Deltapapillomavirus* (BPV -1,2, 13 e 14), *Epsilonpapillomavirus* (BPV -5 e -8), *Xipapillomavirus* (BPV -3,4,6,9,10,11,e 12) e *Dyoxipapillomavirus* (BPV 7) (Lunardi *et al.*, 2012; Bocaneti *et al.*, 2014; Munday *et al.*, 2015; Lunardi *et al.*, 2016). Além destes, há mais de 16 supostos novos tipos de BPVs (White, Howley, 2013).

A infecção pelo papilomavírus bovino (BPV) causa lesões hiperplásicas, definidas como verrugas ou papilomas, que ocorrem na pele e mucosas (Bocaneti *et al.*, 2014). O vírus infecta as células basais do epitélio ou os fibroblastos, formando projeções digitiformes microscópicas ou macroscópicas características (Monteiro *et al.*, 2008). As lesões cutâneas geralmente se encontram distribuídas em grande número pelo corpo do animal infectado, não manifestando predileção por sexo ou raça (Campo, 2002; Mello e Leite, 2003; Carvalho, 2012).

Embora descritos como vírus epiteliotrópicos, esses têm sido encontrados em sangue e em outros sítios não epiteliais (Freitas *et al.*, 2007; Lindsey *et al.*, 2009). Células sanguíneas contendo o genoma de BPV ativo

podem ser responsáveis por disseminar o BPV para numerosos órgãos (Freitas *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2007; Roperto *et al.*, 2011).

Alguns trabalhos descrevem a ocorrência de co-infecção com diferentes tipos de BPV em todo o mundo. No Japão, Ogawa *et al.*, (2004) observaram a presença de BPV em até quatro tipos e supostos novos tipos de BPV no mesmo papiloma no rebanho japonês. No Brasil, a simultânea presença de BPV1 e BPV2 foi detectada em uma mesma lesão (Yagui *et al.*, 2006, 2008, Lindsey *et al.*, 2009).

Além disso, verificaram-se cinco combinações diferentes de infecção múltipla por BPV em bovinos (Claus *et al.*, 2009). A co-infecção com BPV-1 e -2 foi descrita na Índia (Leishangthem *et al.*, 2008; Pangty *et al.*, 2010). Co-infecção com BPV-1 e -11 foi avaliada utilizando um ensaio de genotipagem multiplex BPV em bovinos na Alemanha (Schmitt *et al.*, 2010) e no Brasil, utilizando *primers* específicos para os tipos de BPV, foi observada co-infecção por vários tipos de BPVs (Carvalho *et al.*, 2012, Santos *et al.*, 2013).

O progresso da infecção está relacionado com a eficiência imunológica do hospedeiro. Condições estressantes podem levar a uma baixa da imunidade facilitando o surgimento da doença (Silva *et al.*, 2013c). O objetivo deste trabalho é caracterizar os bovinos quanto à infecção por BPV e analisar a presença de co-infecções em lesões cutâneas e em tecido sanguíneo.

Material e métodos

Foram avaliados 127 bovinos da raça Girolando 5/8, provenientes do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) – Estação Experimental de Itambé (EEI), com uma área de 240 ha, distante do Recife (PE) 102 Km. Bovinos jovens e adultos, com idade variando entre 1 a 16 anos, fêmeas, identificadas através de brincos numerados, criadas de forma semi-intensiva, com alimentação a base de capim elefante (*Penisetum purpureum*), água e sal mineral comercial específico para bovinos *ad libitum*, apresentando ou não lesões cutâneas.

Foram coletadas 127 amostras de sangue por venopunção com o auxílio de tubos a vácuo contendo EDTA. Destes animais foram coletadas 35 amostras provenientes de lesões, com o auxílio de lâminas de bisturi. Por conseguinte foi realizada a extração de DNA total com o auxílio do kit *Blood and Tissue* (Qiagen, Alemanha), seguindo o protocolo do fornecedor. O DNA extraído foi quantificado com o auxílio do equipamento NanoVue (GE, Alemanha).

A viabilidade das amostras de DNA para serem usadas como *template* foi avaliada por PCR para o gene da β -globina bovina. Utilizando-se 100 ng de DNA e o kit Master mix (Promega, USA). As reações foram realizadas nos mesmos parâmetros descritos por Freitas *et al.*, (2007) e os produtos de amplificação (12 μ L) submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

Para a genotipagem dos BPVs presentes nas amostras, foram utilizados *primers* específicos para BPV1, BPV2, BPV3, BPV4, BPV5, BPV6, BPV8, BPV9, BPV10, BPV11, BPV12, BPV13 e BPV14 de acordo com as condições descritas por Silva *et al.*, (2011). Nas amostras provenientes de lesões, não foram testados os tipos de BPV13 e BPV14.

Resultados e discussão

Todos os animais analisados em nosso estudo estavam infectados com no mínimo um tipo de BPV. Todas as amostras de sangue e lesões foram positivas por PCR quanto a sua viabilidade pela amplificação do gene da β -globina bovina.

A presença dos vírus no sangue representa uma preocupação com a transmissão horizontal, onde um animal pode infectar outros por contato direto ou indireto (cercas, bebedouros, cordas, ordenhadeiras, moscas) (Campo, 1997; Stocco dos Santos *et al.*, 1998; Murphy *et al.*, 1999) e na transmissão vertical o animal pode infectar, com maior facilidade, pela via transplacentária ou no parto, a sua prole (Roperto *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011).

Dentre os fatores que podem estar relacionados com a papilomatose bovina, está a capacidade de obter uma resposta imune eficiente. As infecções causadas por papilomavírus desencadeiam uma resposta imune no hospedeiro, levando, na maioria dos casos à regressão da doença (Borzacciello e Roperto, 2008). Em alguns casos provocados por tipos de vírus específicos podem vir a se tornar lesões malignas (De Villiers *et al.*, 2004). Essa formação de lesões malignas, está associada a diversos co-fatores ambientais (Campo, 2006).

Os tipos de BPV encontrados nas amostras de sangue foram: BPV 10 (97,75%), BPV 12 (92,13%), BPV 2 e BPV9 com (88,76%), BPV 1 (66,29%), BPV 11 (20,22%), BPV 6 (8,98%), BPV 4 (7,86%) e BPV3 (1,12%). O BPV5 e BPV8 e BPV13 não foram detectados. Diferente de Santos *et al.*, (2013) que encontraram os tipos de BPVs 1 e 2 como os mais prevalentes no sangue de bovinos, o mesmo ocorrido com os estudos de Diniz *et al.*, (2009). Entretanto a alta prevalência de BPV1 e -2 pode estar relacionada com a presença desses tipos virais em lesão de pele (Carvalho *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012).

Os tipos de BPV encontrados nas lesões foram: BPV2 e BPV3 (100%), BPV 11 (97,1%), BPV 10 (94,2%), BPV 12 (91,42%), BPV 4 (82,85%), BPV 6 (80,0 %), BPV 8 (68,57%), BPV 9 (31,42%), resultados próximos aos obtidos por Carvalho *et al* (2012). Os BPVs -1, -5 não foram detectados. Os tipos de BPVs -7,-13 e -14 não foram testados.

Geralmente os papilomavírus são descritos como epiteliotrópicos, no entanto, o DNA de BPV foi detectado em diferentes sítios como o sêmen (Silva

et al., 2011, 2013a) sangue periférico, leite, plasma e colostro (Stocco dos Santos *et al.*, 1998). O tecido sanguíneo foi identificado como propício a infecção pelo BPV (Roperto *et al.*, 2011), podendo ser transportado para todo o corpo do animal e para tecidos não epiteliais (Freitas *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2013) tornando o sangue como veículo disseminador do vírus por todo o corpo do animal, podendo facilitar a infecção pelo BPV.

O BPV4 apresentou uma pequena quantidade de amostras positivas, no sangue, resultados semelhantes com o encontrado na literatura (Santos *et al.*, 2013). Já nas amostras de lesões, o BPV4 foi detectado em mais de 80%, esse resultado está de acordo com o encontrado na literatura para amostras originárias de lesões (Carvalho *et al.*, 2012; Silva *et al.* 2012).

Os tipos BPV3 e BPV6 apresentaram uma baixa frequência em relação aos tipos mais encontrados nas amostras de sangue, resultados divergentes dos detectados por Santos *et al.* (2013); que em suas análises em tecido sanguíneo, identificaram mais de 50% das amostras com os BPV3 e BPV6. A discrepância entre os resultados pode ser explicada pela diferença nas populações estudadas por Santos *et al.* (2013) que são oriundas de fazendas do interior da Bahia, Brasil e os bovinos do nosso estudo são procedentes da estação experimental do IPA em Pernambuco, Brasil.

Nas amostras de sangue analisadas em nosso estudo, não foram encontrados os tipos de BPV5 e -8. Estes resultados diferem da literatura onde os papilomas bovinos têm sido diagnosticados em todo o mundo. Santos *et al.*, (2013) em suas análises verificaram a presença de BPV8 em amostras de sangue em bovinos de fazendas do interior da Bahia, Brasil, e a ausência de BPV5 em suas amostras o mesmo ocorrido em nosso estudo.

Na literatura podemos observar que o tipo viral mais comum em lesões cutâneas ocorre com os tipos virais BPV1 e BPV2 (Freitas *et al.*, 2003, 2007; Carvalho *et al.*, 2012), por esse motivo o número de dados sobre esses tipos virais se apresentam com maior volume na literatura. Entretanto em amostras de sangue os BPVs -1 e -2 são os tipos virais mais estudados (Freitas *et al.*, 2003; Roperto *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2013a, b, c), tornando necessário estudos mais amplos com a inclusão de todos os tipos virais em sítios não epiteliais, como o sangue, sêmem e leite.

Em nossos estudos, podemos observar a presença em grande quantidade dos novos tipos de BPV (-11, -12 e -14) circulantes na Estação Experimental de Itambé - IPA, tanto em lesão cutânea como no tecido sanguíneo. O BPV12 foi o mais encontrado nas amostras analisadas e o BPV14 foi detectado nas amostras de sangue, em mais de 50% dos animais, esse novo tipo viral foi descrito por Batista *et al.* (2013) BPV/UFPE04BR (GenBank accession number: JQ897975). O qual foi confirmado por sequenciamento e apresentaram 98% de similaridade no software BLAST, com nossas amostras de sangue, positivas para o BPV14.

O BPV11 apresentou uma alta incidência nas amostras oriundas de lesão cutâneas, já nas amostras de sangue não foram detectadas em grande quantidade. O BPV13 não foi detectado em nenhuma das amostras de sangue, esse dado sugere que outros estudos devem ser iniciados para a confirmação dessa informação.

A co-infecção nas amostras de sangue foi observada em 99% das amostras analisadas, com dois ou mais tipos de BPV. A múltipla infecção mais frequente em nosso estudo se apresentou com seis tipos diferentes de BPV (-1,-2,-9,-10,-12 e -14). A múltipla infecção com cinco tipos diferentes de BPV foi a segunda mais frequente. Amostras com quatro tipos diferentes de BPVs foi o terceiro tipo mais predominante em nosso estudo.

A co-infecção com dois e três tipos diferentes de BPV foi o quarto tipo mais comum com 18 animais. 17 bovinos apresentaram sete tipos diferentes de BPVs, um animal apresentou nove tipos diferentes de BPVs e apenas um dos animais apresentaram infecção por um único tipo de BPV.

Em nosso estudo foi encontrado em quase todas as amostras, (com exceção de uma) múltiplos tipos de BPVs com até nove tipos diferentes de amostras de sangue de bovinos. Santos *et al.*, (2013) em seus estudos detectou múltiplos tipos de BPVs em amostras de sangue, com cinco tipos de BPV por amostra. De acordo com Batista *et al.*, (2013), as co-infecções podem ser uma consequência da imunossupressão, facilitando a existência de infecções persistentes em rebanhos bovinos.

Em nosso estudo foi encontrado em 126/127 das amostras, vários tipos de BPVs nas amostras de sangue, com até nove tipos diferentes por bovinos.

Santos *et al.*, (2013), em seus estudos detectou múltiplos tipos de BPVs em amostras de sangue, com cinco tipos por amostra.

Nas amostras de lesões foi constatado a co-infecção em 100% das amostras, com cinco ou mais tipos diferentes de BPV, a múltipla infecção mais frequente com oito tipos diferentes de BPV (-2,-3,-4,-6,-8,-10,-11 e -12) em 13/35, o segundo tipo mais comum foi com sete tipos de BPVs com 11/35 o terceiro tipo de múltipla infecção mais frequente foi com 6 e 9 tipos de BPVs ambas com 5/35, apenas uma amostra foi detectada com cinco tipos diferentes de BPV.

De acordo com Batista *et al.*, (2013), as co-infecções podem ser uma consequência da imunossupressão, facilitando a existência de infecções persistentes em rebanhos bovinos. Não há relatos na literatura relacionados com os vírus que compõem o quadro de uma co-infecção, se eles estão sendo expressos ou apenas estão presentes e inativos, nas lesões ou em sítios não epiteliais, sendo necessários mais estudos para elucidar esse questionamento.

Conclusão

Todos os animais avaliados apresentaram-se infectados por BPV, demonstrando alta infecção no rebanho estudado. Os novos tipos de BPV foram encontrados nas amostras analisadas, com exceção do BPV 13.

A co-infecção foi verificada em 99% das amostras sanguíneas avaliadas, nas amostras originárias de lesão em 100% foi observada a múltipla infecção, o que demonstrou um elevado número de tipos virais por animal.

Referências bibliográficas

Batista VAM, Silva ARM, Pontes NE, Reis CM, Corteggio A, Castro SR, Borzacchiello G, Balbino QV and Freitas AC (2013) Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identifications of a putative new virus type in Brazilian cattle. *Vet. J.* 197:368–373.

Bocaneti F, Altamura G, Corteggio A, Velescu E, Roperto F and Borzachiello G (2014) Bovine papillomavirus: New insights into an old disease *Transbound Emerg Dis.* Doi:10.1111/tbed.12222: 1-10

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

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

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

Campo MS (2006) Bovine papillomavirus: old system, new lessons? In: Campo, M.S. (ed), *Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond*, Caister Academic Press, Scotland 373-383.

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

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.

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

Diniz N, Melo TC, Santos JF, Mori E, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Freitas AC, Becak W, Carvalho RF and 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.

Freitas AC, Carvalho C, Brunner O, Jr Birgel EH, Libera AMD, Benesi FJ, Becak W and Stocco dos Santos RC (2003) Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: 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* 697-704.

Freitas AC, Silva MAR, Jesus ALS, Mariz FC, Cordeiro MN, Albuquerque BMF and Batista MVA (2011) Recent insights into Bovine papillomavirus. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5:6004–6012.

International Committee on Taxonomy of Viruses (2014) disponível em: http://ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20120358&taxa_name=Papillomaviridae. Acesso em: 04.05.2015.

Leishangthem GD, Somvanshi R, Tiwari AK (2008) Detection of bovine papilloma-viruses 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.

Lunardi M, Alfieri AA, Otonel RA, Alcantara BK, Rodrigues WB, Miranda AB and Alfieri AF (2012) Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet. Microbiol.* 162:207-213.

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

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: 04.05.2015.

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

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

Murphy FA, Gibbs EP, Horzineck MC, Studdert MJ (1999) Poxviridae. *Veterinary Virology Academic Press.* 277-291.

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.

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

Reperto S, Paolini F, Urraro C, Russo V, Borzacchiello G, Raso C, Rizzo C, Reperto F and Venuti A (2008) Detection of bovine papillomavirus type 2 in

peripheral blood of cattle urinary bladder tumours: possible biological role. *J. Gen. Virol.* 89:3027–3033.

Roperto S, Comazzi S, Paolini F, Borzacchiello G, Esposito I, Russo V, Urraro C, Venuti A and Roperto F (2011) Peripheral blood mononuclear cells are additional sites of productive infection of bovine papillomavirus type 2. *J. Gen. Virol.* 92:1787–1794.

Santos EUD, Silva MAR, Pontes NE, Coutinho LCA, Paiva SSL, Castro RS and Freitas AC (2013) Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of Cattle DOI:10.1111/tbed.12237

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*, 170:67-72.

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 (*Bostaurus*). *Anim. Reprod. Sci.* 129(3-4):146-151.

Silva MAR, Carvalho CCR, Coutinho LCA, Reis MC, de Aragão Batista MV, de Castro RS, dos Anjos FBR and Freitas AC (2012) Co-infection of Bovine Papillomavirus and Feline-Associated Papillomavirus in bovine cutaneous warts. *Transbound. Emerg. Dis.* 59:539–543.

Silva MAR, Altamura G, Corteggio A, Roperto F, Bocaneti F, Velescu E, Freitas AC, Carvalho CCR, Cavalcanti KPS and Borzachiello G (2013a) Expression of connexin 26 and bovine papillomavirus E5 in cutaneous fibropapillomas of cattle. *Vet. J.* 195:337–343.

Silva MAR, Silva KMG, Jesus ALS, Barros LO, Corteggio A, Altamura G, Borzacchiello G and Freitas AC (2013b) The presence and gene expression of Bovine papillomavirus in the peripheral blood and semen of healthy horses. *Transbound. Emerg. Dis.* 61(4)329-333.

Silva MAR, De Albuquerque BMF, Pontes NE, Coutinho LCA, Leitão MCG, Reis MC, Castro RS and Freitas AC (2013c) Detection and expression of Bovine papilloma virus in blood of healthy and papillomatosis-affected cattle. *Genet. Mol. Res.* 12:3150–3156.

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

Stocco dos Santos RC, Lindsey Cj, Ferraz O, Pinto JR, Mirandola RS, Benesi FJ, Birgel EH, Bragança PCA and Beçak W (1998) bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: a experimental model. *Jornal of General Virology* 79:2127-2135.

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

Yagui A, Carvalho C, Freitas AC, Góes LGB, Dagli MLZ, Birgel Jr EH, Stocco dos Santos RC (2006) Papilomatosis in cattle: In situ detection of bovine papilomavirus DNA sequences in reproductives tissues. *Braz J. Morphol.* 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.

Artigo II

Estudo dos SNPs do gene *MBL2* com a susceptibilidade à papilomatose bovina, em bovinos da região Nordeste do Brasil.

Estudo dos SNPs do gene *MBL2* com a susceptibilidade à papilomatose bovina, em bovinos da região Nordeste do Brasil.

M. E. Junior-Pessoa¹, P.G. Carrazzoni², F. Tenorio-Filho², N.E. Pontes¹, L. Gomes¹, M.A.R. da Silva³, A.P.D. Gurgel¹, A.C. de Freitas¹

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

² Instituto Agrônomo de Pernambuco, Recife, Brasil.

³ Instituto Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

Resumo

A papilomatose bovina é uma doença infecto-contagiosa causada pelo Papillomavírus Bovino (BPV). Os Polimorfismos de Base Única (SNPs) em genes responsáveis pela imunidade inata tem sido objeto de estudo de várias pesquisas e apresentam grande importância na susceptibilidade dos animais a infecções. O presente estudo tem como objetivo avaliar a existência de associação de polimorfismos do gene *MBL2* e a papilomatose bovina. Em nosso estudo foram avaliados 187 bovinos da raça Girolando 5/8. Foi realizada coleta de sangue, extração de DNA, PCR para o exon 1 do gene *MBL2*, sequenciamento e análises das sequências. As 187 amostras de sangue testadas para o gene *MBL2*, 93,58% foram positivas (175/187), apresentando amplicons com 247 pares de bases. As amostras positivas para o exon 1 do *MBL2* (175/187), foram sequenciadas e 167 amostras (167/175), apresentaram sequências com cromatogramas de boa qualidade e valores de Phred iguais ou superiores a 30. Nas análises dos polimorfismos para o exon 1 de *MBL2* foram detectados 245 sítios conservados e 02 sítios variáveis, sendo dois informativos. Na avaliação das frequências alélicas e genotípicas dos dois SNPs do exon 1 de *MBL2* e de sua associação com a presença de BPV, foi observado que nenhum desses dois SNPs obteve associação para suscetibilidade com BPV, apresentando p-values acima de 5%. Nas amostras avaliadas, não foram encontradas associações com os SNPs do gene *MBL2* (exon1) e a papilomatose bovina.

Palavras chave: BPV, Polimorfismo, Bovinos, Papilomavírus, *MBL2*

Introdução

A papilomatose bovina é uma doença infecto-contagiosa causada pelo vírus Papillomavírus Bovino (BPV) que compromete a produtividade do rebanho. É importante economicamente porque leva à redução da produção do leite, baixo ganho de peso e deterioração da aparência e do couro animal (Freitas *et al.*, 2011; Bocaneti *et al.*, 2014). Os papilomavírus são classificados na família *Papillomaviridae*, a qual compreende 29 gêneros. Eles abrangem um grupo heterogêneo de vírus, não envelopado de DNA fita dupla circular e epiteliotrópico (Bocaneti *et al.*, 2014).

Existem relatos de bovinos infectados com mais de um tipo de BPV, além de animais que não apresentam os sintomas da doença (Carvalho *et al.*, 2012), indicando que o BPV é necessário mas não suficiente para o desenvolvimento das lesões. As infecções causadas por papilomavírus desencadeiam uma resposta imune no hospedeiro, levando, na maioria dos casos à regressão da doença (Borzacciello e Roperto, 2008). Em alguns casos provocados por tipos virais específicos podem vir a se tornar lesões malignas (De Villiers *et al.*, 2004).

O estudo de polimorfismos de base única (SNPs) em genes associados à fisiopatologia e a patogenia de doenças vem sendo desenvolvido e a variação desses genes pode predispor à susceptibilidade ou proteção a doenças (Lin Albertson, 2004; Suffredini Chanock, 2006; Clark Baudouin, 2006).

Os polimorfismos na região promotora do gene *MBL* resultam na diminuição de expressão da molécula, enquanto que, na região codificante as mutações causam incapacidade de manter a conformação oligomérica necessária para fixar a manose e ativar o complemento levando também a baixos níveis séricos (Garred *et al.*, 2003). Estas mutações são associadas ao curso desfavorável não só de infecções bacterianas, mas também, às causadas por vírus (Thomas *et al.*, 1996).

O gene *MBL2* está localizado no cromossomo 26 em bovinos (Gjerstorff *et al.*, 2004), contém três introns e quatro exons codificando 249 aminoácidos. Mutações no gene *MBL2* têm contribuído na susceptibilidade de animais a

vários agentes infecciosos (Holmskov *et al.*, 2003; Lillie *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2005; Capparelli *et al.*, 2008).

Variações na sequência de nucleotídeos foram encontradas nas regiões codificantes e nas não codificadoras do gene de *MBL* em humanos, ovinos e suínos. Essas variações podem afetar a montagem ou formação da *MBL*, levando assim a um baixo nível e disfunções imunológicas inatas plasmáticas (Madsen *et al.*, 1998; Lillie *et al.*, 2007; Thiel and Gadjeva, 2009; Juul-Madsen *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011).

Em bovinos, a ocorrência de polimorfismos nos genes *MBL2* está associada com a falha no controle da mastite, prejudicando assim a produção de leite (Wang *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2012). Alguns estudos estabeleceram que o polimorfismo no locus *MBL2* de búfalo está associado com a resistência à infecção por *Brucella abortus*.

São escassas as informações disponíveis sobre o gene *MBL2* e suas variantes, bem como as suas relações com a resistência a doenças (Wang *et al.*, 2012). O presente estudo tem como objetivo avaliar a existência de associação de polimorfismos do gene *MBL2* e a papilomatose bovina.

Material e métodos

Neste trabalho foram avaliados 187 bovinos da raça Girolando 5/8, provenientes do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) – Estação Experimental de Itambé (EEI), Pernambuco, Brasil, e 60 animais provenientes de fazendas do recôncavo baiano, Bahia, Brasil, totalizando 187 animais, todas fêmeas criadas de forma semi-intensiva, com alimentação a base de capim elefante (*Penisetum purpureum*), água e sal mineral comercial específico para bovinos *ad libitum* com lesões e sem lesões cutâneas.

Os animais foram organizados em dois grupos. Grupo 1: animais apresentando lesões cutâneas e grupo 2: animais sem lesões.

Amostras de sangue foram coletadas por venopunção com o auxílio de tubos a vácuo contendo EDTA. Destas amostras foi realizada a extração de DNA total com o auxílio do kit *Blood and Tissue* (Qiagen, Alemanha), seguindo o protocolo do fornecedor. O DNA extraído foi quantificado com o auxílio do equipamento NanoVue (GE, Alemanha).

A viabilidade das amostras de DNA para serem usadas como *template* foi avaliada por PCR para o gene da β -globina bovina. Utilizando-se 100 ng de DNA e o kit Master mix (Promega, USA). As reações foram realizadas nos mesmos parâmetros descritos por Freitas *et al.*, (2007) e os produtos de amplificação (12 μ L) submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados.

A avaliação da existência do polimorfismo do gene *MBL2* na região do *exon 1*, foi realizada utilizando a técnica da PCR com primers específicos, que amplifica fragmentos com 247 pb, seguindo as condições sugeridas por Wang *et al.*, (2012). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, purificados e sequenciados.

Os produtos das PCRs específicas para os genes *MBL2* (9 μ L) foram submetidos à purificação utilizando os kits comerciais GFX PCR DNA e Band Purification (GE Healthcare) e posteriormente sequenciados com o kit Big Dye Terminator 3.1v (GE Healthcare), em sequenciador automático (3500 Applied Biosystems). Na Plataforma Multiusuário do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Sequências consenso foram geradas com base nos valores de Phred 30 ou superiores, com o programa Staden (Staden *et al.*, 2000) e validadas por meio do software BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Foram analisadas 167 sequências para o exon 1 do gene *MBL2*.

As sequências foram alinhadas utilizando o programa MEGA v. 5.3 (Tamura *et al.*, 2011), que foi utilizado para visualizar e quantificar os polimorfismos. As associações dos SNPs com a doença, foram realizadas com o auxílio do software SNPStats (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web), admitindo-se um nível de significância de 5% (Solé *et al.*, 2006).

A associação entre os polimorfismos e o desenvolvimento das lesões foi estimada pelo teste de Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95%. A partir das frequências genotípicas observadas foram determinadas as frequências alélicas e as frequências genotípicas esperadas. Mediante a comparação das frequências genotípicas esperadas e observadas foi determinado se a população estava ou não em equilíbrio de Hardy e Weinberg. A estimativa das diferenças significativas na distribuição dos genótipos foi realizada utilizando o teste de X^2 .

Resultados e Discussão

Das 187 amostras de sangue testadas para o gene *MBL2* 93,58% foram positivas (175/187), apresentando amplicons com 247 pares de bases, as amostras positivas para o gene *MBL2* (175/187), foram sequenciadas e dessas, 167 amostras (167/175), apresentaram sequências com cromatogramas de boa qualidade e valores de Phred iguais ou superiores a 30, viabilizando a correta análise das sequências para posterior identificação de SNPs. As demais amostras que apresentaram valores de Phred inferior a 30 foram descartadas das análises.

A especificidade das reações de sequenciamento foi confirmada através da análise realizada com o software BLAST, que detectou elevados valores de identidade dos produtos sequenciados para o exon 1 do *MBL2*, com valores de 99% de identidade, quando comparadas com o banco de dados do NCBI, demonstrando a confiabilidade das reações de PCR. As reações de PCRs para o exon 1 do gene *MBL2*, apresentaram 12 amostras negativas (12/187) o que pode ter ocorrido pela baixa concentração do DNA em algumas amostras, sendo necessário o aumento da concentração em algumas reações de PCR.

Nas análises dos polimorfismos para o exon 1 de *MBL2* foram detectados 245 sítios conservados e 02 sítios variáveis, sendo estes dois informativos. Os sítios informativos foram encontrados nas regiões 235 G/A e 244 T/C. A presença de mutações no gene *MBL2* tem contribuído na susceptibilidade de animais a diversos agentes infecciosos (Holmskov *et al.*, 2003; Lillie *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2005; Capparelli *et al.*, 2008).

Avaliação das frequências alélicas e genótípicas dos dois SNPs do exon 1 de *MBL2* e de sua associação com a presença de BPV, foi observado que nenhum desses dois SNPs obteve associação para suscetibilidade com BPV, apresentando p-values acima de 5%. Tabela 1.

Tabela1: Frequências alélicas e genótípicas do exon 1 do gene *MBL2*

	Com Lesão n=92 (%)	Sem Lesão n=75 (%)	p-value, OR [95% IC]
SNP1 (235 G/A)			
Alelos			
G	163 (88)	125 (83)	Referência
A	21 (12)	25 (17)	0.201, 0.645 [0.32 -1.26]
Genótipos			
GG	72 (78)	51 (68)	Referência
GA	19 (21)	23 (31)	0.15; 0.587 [0.27 -1.25]
AA	1 (1)	1 (1)	1; 0.71 [0.008 – 56.6]
SNP2 (244 T/C)			
Alelos			
T	163 (88)	125 (83)	Referência
C	21 (12)	25 (17)	0.201 0.645 [0.32 -1.26]
Genótipos			
TT	72 (78)	51 (68)	Referência
TC	19 (21)	23 (31)	0.15; 0.587 [0.27 -1.25]
CC	1 (1)	1 (1)	1; 0.71 [0.008 – 56.6]

Os dois SNPs encontrados em nosso estudo para o exon 1 do gene *MBL2*, estão de acordo com os descritos na literatura por Wang *et al.* (2012). Porém nesse mesmo estudo, são descritos mais dois SNPs, que não foram encontrados em nosso trabalho, fato que pode ser explicado pelo baixo número de amostras sequenciadas e analisadas, ou até diferenças nas populações estudadas, visto que os animais do nosso estudo provém do interior de Pernambuco e da Bahia, Brasil e os animais estudados por Wang *et al* (2012) são provenientes da China.

Os SNPs 235 G/A e 244 T/C do exon 1 do gene *MBL2* estão em equilíbrio de Hardy Weinberg para os bovinos com lesão com valores de: $p=0.837$; $X^2= 0.041$ e estão em equilíbrio de Hardy Weinberg para os bovinos sem lesão com valores de: $p= 0.367$, $X^2=0.8112$.

Conclusão

Nas amostras avaliadas não foram encontradas associações com os SNPs do gene *MBL2* (exon1) e a papilomatose bovina.

Referências bibliográficas

Bocaneti F, Altamura G, Corteggio A, Velescu E, Roperto F and Borzachiello G (2014) Bovine papillomavirus: New insights into an old disease Transbound Emerg Dis. Doi:10.1111/tbed.12222: 1-10

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

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

Clark MF, Baudouin SV (2006) A systematic review of the quality of genetic association studies in human sepsis. Intensive Care Medicine. 32:1706-1712.

Capparelli R, Parlato M, Amoroso MG, Roperto S, Marabelli R, Roperto F, Iannelli D (2008) Mannose-binding lectin haplotypes influence *Brucella abortus* infection in the water buffalo (*Bubalus bubalis*). Immunogenetics 60:157–165.

Costa APP, Garcia AHC, Copreski B e Brunoni D (2007) Estudos de polimorfismos de DNA associados aos distúrbios do desenvolvimento. Cad de Pós_Grad em Disturb do Desenvol 7: 112-131.

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

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 697-704.

Freitas AC, Silva MAR, Jesus ALS, Mariz FC, Cordeiro MN, Albuquerque BMF and Batista MVA (2011) Recent insights into Bovine papillomavirus. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5:6004–6012.

Garred P, Madsen HO, Balslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J and Svejgaard A (1997) Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* 349 (9047):236-240.

Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C (2003) Mannose-binding lectin deficiency revisited. *Mol Immunol.* 40: 73-84.

Garred P, Larsen F, Seyfarth J, Fujita R, Madsen HO (2006) Mannose binding lectin and its genetic variants. *Genes Immun.* 7:85–94.

Gjerstorff M, Hansen S, Jensen B, Dueholm B, Horn P, Bendixen C, Holmskov U (2004) The genes encoding bovine SP-A, SP-D, MBL-A, conglutinin, CL-43 and CL-46 form a distinct collectin locus on *Bos taurus* chromosome 28 (BTA28) at position q.1.8–1.9. *Anim. Genet.* 35:333–337.

Grant T, Frost DR, Caldwell JP, Gagliardo R, Haddad CFB, Kok PJR, Means DB, Noonan BP, Schargel WE and Wheeler WC (2006) Phylogenetic systematics of dart-poison frogs and their relatives (Amphibia: Athesphatanura: Dendrobatidae). *Bulletin Am Mus Nat Histor* 299: 1-262.

Holmskov U, Thiel S, Jensenius JC (2003) Collectins and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu. Rev. Immunol.* 21:547–578.

Juul-Madsen HR, Kjærup RM, Toft C, Henryon M, Heegaard PM, Berg P, Dalgaard TS (2011) Structural gene variants in the porcine mannose-binding lectin 1 (MBL1) gene are associated with low serum MBL-A concentrations. *Immunogenetics* 63:309–317.

Kimura L (2010) Fatores genéticos associados à hipertensão essencial em populações remanescentes de quilombos do Vale do Ribeira-SP. Tese (Doutorado) USP – São Paulo, SP, Brasil.

Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, Ohashi K and Onuma M (2006) Tumor necrosis factor-alpha genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. *Microbes infect.* 8:2163-2171.

Lin MT, Albertson TE (2004) Genomic polymorphisms in sepsis. *Critical Care Medicine.* 32:569-579.

Lillie, BN, Brooks AS, Keirstead ND, Hayes MA (2005) Comparative genetics and innate immune functions of collagenous lectins in animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108:97–110.

Lillie BN, Keirstead ND, Squires EJ, Hayes MA (2007) Gene polymorphisms associated with reduced hepatic expression of porcine mannan-binding lectin C. *Dev. Comp. Immunol.* 31:830–846.

Liu J, Ju Z, Li Q, Huang J, Li R, Li J, Ma L, Zhong J, Wang C (2011) Mannose-binding lectin 1 haplotypes influence serum MBL-A concentration, complement activity, and milk production traits in Chinese Holstein cattle. *Immunogenetics* 63:727–742.

Madsen HO, Satz ML, Høgh B, Svejgaard A, Garred P (1998) Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America. *J. Immunol.* 161:3169–3175.

Staden R, Beal KF and Bonfield JK (2000) The Staden package 1998. *Methods molecular biology* 132: 115-130.

Solé X, Guino E, Valls J, Iniesta R and Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22: 1928–1929.

Souza MBR and Oliveira JRM (2012) Searching for New Genetic Variations in Expression Databases for the GABAergic and Glutamatergic Systems 48: 257-264.

Suffredini AF, Chanock SJ (2006) Genetic variation and the assessment of risk in septic patients. *Intensive Care Medicine*. 32:1679-1680.

Takahashi R, Tsutsumi A, Ohtani K, Muraki Y, Goto D, Matsumoto I, Wakamiya N, Sumida T (2005) Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 64:311–314.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M and Kumar S (2011) “MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.”. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Thiel S, Gadjeva M (2009) Humoral pattern recognition molecules: mannan-binding lectin and ficolins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 653:58–73.

Thomas HC, Foster GR, Sumiya M, McIntosh D, Jack DL, Turner MW (1996) Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet*. 348: 1417-1419.

Turner MW (1998) Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease. *Immunol* 199: 327-339.

Turner MW and Hamvas RM (2000) Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associated Reviews in Immunogenetics 2: 305-322.

Wang X, Ju Z, Huang J, Hou M, Zhou L, Qi C, Zhang Y, Gao Q, Pan Q, Li G, Zhong J and Wang C (2012) The relationship between the variants of the

bovine MBL2 gene and milk production traits, mastitis, serum MBL-C levels and complement activity. *Vet. Immunol. Immunop.* 148:311-319.

Zhao ZL, Wang CF, Li QL, Ju ZH, Huang JM, Li JB, Zhong JF and Zhang JB (2012) Novel SNPs of the mannan-binding lectin 2 gene and their association with production traits in Chinese Holsteins. *Genet. Mol. Res.* 11 (4):3744-3754.

Instrução aos autores

Revista *Transboundary and Emerging Diseases*

1. GENERAL

Transboundary and Emerging Diseases brings together in one place the latest research on infectious animal diseases considered to hold the greatest economic threat to animals worldwide. The journal provides a venue for global research on the sources favoring their diagnosis, prevention and management, and for papers on veterinary public health, pathogenesis, epidemiology, statistical modeling, diagnostics, biosecurity issues, genomics, vaccine development and rapid communication of new outbreaks.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Transboundary and Emerging Diseases*. Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell Publishing's Author Services further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Transboundary and Emerging Diseases adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authorship: Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript has been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

Transboundary and Emerging Diseases adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or

analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under Acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. **Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.**

2.2. Ethical Approvals

Experimental Subjects: experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort.

Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations. All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

Ethics of investigation: Papers not in agreement with the guidelines of the Helsinki Declaration as revised in 1975 will not be accepted for publication.

2.3 Appeal of Decision

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by e-mailing the editorial office with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.4 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.5 Copyright Assignment

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--license.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)] you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with your Funder requirements.

For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site ScholarOne Manuscripts. The use of an online submission and peer review site speeds up the decision-making process, enables immediate distribution, and allows authors to track the status of their own manuscripts. If assistance is needed (or if for some reason online submission is not possible), the Editorial Office can be contacted and will readily provide any help users need to upload their manuscripts.

Editorial Office:

Iduna Haus email: iduna-haus@ethz.ch

Online Submission: To submit a manuscript, please follow the instructions below.

3.1. Getting Started

1. Launch your web browser (Internet Explorer 5 or higher or Netscape 7 or higher) and go to the journal's Manuscript Central homepage (<http://mc.manuscriptcentral.com/tbed>).
2. Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user of Manuscript Central.
3. If you are creating a new account.- After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important. - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.' - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail

address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.

4. Log-in and select 'Author Center.'

3.2. Submitting Your Manuscript

1. After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link in the menu bar.
 2. Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
 3. Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
 4. You are required to upload your files. - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer. - Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button. - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
 5. Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. After submission, you will receive a confirmation e-mail. You can also access Manuscript Central any time to check the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and

figure legends, but *no* embedded figures. Figure tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

Revised manuscripts must be uploaded within 2 months of authors being notified of conditional acceptance pending satisfactory revision.

Reviewers evaluate the papers, the Editors decide on acceptance, changes, or rejection. No changes will be made without the approval of the author. Your manuscript will be destroyed three months after publication. Only appropriately marked originals will be returned. The publisher cannot be held responsible for any damage or loss through the post.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Transboundary and Emerging Diseases* will be reviewed by two experts in the field. *Transboundary and Emerging Diseases* uses single-blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Articles should not exceed 30 typewritten pages, including illustrations, tables and references.

Review Articles including illustrations, tables and literature references - should not exceed 40 typewritten pages (format DIN A4 or 8.5 × 11'). The number of illustrations and tables must be kept to a minimum.

Rapid Communications are a concise but complete description of a limited investigation of a newly emerging pathogen or disease situation of high importance for either or both animal and human health. Rapid Communications will be published on an accelerated turn-over to ensure fast dissemination of the

content, reflecting the importance of the topic. They should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper and not exceed 6 printed pages with figures, tables and references (about 12 manuscript pages including no more than a total of 4 figures and tables). Headings should be Introduction, Materials and Methods with the Results and Discussion combined and a maximum total text word count of 3000.

Short Communications should not exceed 5 typewritten pages, including figures, tables and references. Short Communications may be published more rapidly.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscripts are professionally edited. Visit our site to learn about the options. Please note that using the Wiley English Language Editing Service does not guarantee that your paper will be accepted by this journal.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature All specifications must be stated according to the S.I. system. Concentrations of chemical solutions are to be given in mol/l. All other concentrations should be given in % (volume or weight). Any abbreviations of chemical, biological, medical or other terms should only be employed when it is certain that they are internationally known. The full name must be stated in brackets when the abbreviation is first used.

All biological, medical, chemical or other terms should be used according to the most recent recommendations of the respective international nomenclature. Enzymes should be given in I.U. (International Units), according to *Enzyme Nomenclature* (Elsevier Publishing Co., 1965). In the case of commercially obtained substances or reagents, when they are first mentioned in the text, the name and address of the manufacturer or supplier should be given as a footnote. Products (preparations etc.) with a registered trademark should be marked with ®.

Bacterial names should be in accordance with the latest edition of *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (The Williams and Wilkins Co., Baltimore). Viruses are to be given the classification and names recommended by the International Committee on the Nomenclature of Viruses.

Names of micro-organisms and zoological names will be printed in italics and should be underlined in the manuscript.

5.2. Structure

All manuscripts submitted to *Transboundary and Emerging Diseases* should include:

On page one of the manuscript, please include the corresponding author, name of the institution, place where the work was carried out, title of the manuscript, short title for running head of manuscript, names of the authors, the addresses of the authors and the e-mail address of the corresponding author. Each original article should be divided into Summary and Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and References. Summaries should not be longer than 300 words and up to six keywords should be provided.

The manuscript comprises the text and a list of all figures and tables with their captions and titles in a separate file. We ask that you convey the essential information within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition. Each figure, table, and bibliographic entry must have a reference in the text. For all figures please include reproduceable artwork (marked with the author's name, short title, and figure number). Any corrections requested by the reviewer should already be integrated into the file.

The data files must be PC/Windows-compatible. Please send the figures as separate files and do not import them into the text file. The text should be prepared using standard software (Microsoft Word, Word Perfect) or saved in rtf format; do not use automated or manual hyphenation. Please do not include footnotes.

Optimizing Your Abstract for Search Engines Many students and researchers looking for information online will use search engines such as Google, Yahoo or similar. By optimizing your article for search engines, you will increase the chance of someone finding it. This in turn will make it more likely to be viewed and/or cited in another work. We have compiled these guidelines to enable you to maximize the web-friendliness of the most public part of your article.

5.3. References

Each original paper should include bibliographical references which should be restricted to the necessary minimum. The name of the journal in which the paper cited appears should be listed in the form of the abbreviated title from the cover of the journal concerned, otherwise use the abbreviations contained in a *Bibliographic Guide for Editors & Authors* from Chemical

Abstracts, which is available in all major libraries, or the *World List of Scientific Periodicals*, 4th ed., London 1963-65. Anonymous contributions should be placed at the beginning of the list of references. The list of references should be in alphabetical order of first authors' names.

Please ensure that references in the text exactly match those in the manuscript's reference list. If editing sections of text please ensure that any references that are affected are amended accordingly in the reference list. Reference to personal communications and unpublished results should be in the text only i.e. (Animal Health Care Flanders, personal communication, 2006) or (Zhang, F., unpublished results). Examples: **Journal** Valarcher, J.-F., Y. Leforban, M. Reweyemamu, P.L. Roeder, G. Gerbier, D.K.J. Mackay, K.J. Sumption, D.J. Paton, and N.J. Knowles, 2008: Incursions of foot-and-mouth disease virus into Europe between 1985 and 2006. *Transbound. Emerg. Dis.* 55, 14-34. **Book** Agresti, A., 2002: *Categorical Data Analysis*, 2nd edn. Wiley, New York. **Chapter in Edited Book** Thomson, G.R., and A.D.S. Bastos, 2004: Foot-and-mouth disease. In: Coetzer, J.A.W., and R.C. Tustin (eds), *Infectious Diseases of Livestock*, 2nd edn. pp. 1324-1365. Oxford University Press, South Africa. **Report** Sealander, J. A., P. S. Gipson, M. E. Cartwright, and J. M. Pledger, 1975: *Behaviour and Physiological Studies of Relationships between White-tailed Deer and Dogs in Arkansas*. Final Report to Arkansas Game and Fish Commission. Department of Zoology, University of Arkansas, Fayetteville. **PhD thesis** Author, A. 2003: Thesis title with lower case initials to all words. PhD thesis, University, Town, Country. **Web Page** American Veterinary Medical Association, 2006: Equine Influenza Backgrounder. Available

at:http://www.avma.org/public_health/influenza/equine_bgnd.asp (accessed 22 October 2007).

References in the text to literature in the Reference List should be given by placing in parenthesis the name(s) of the author(s), adding the year of publication (e.g.: Smith and Jones, 2003). For more than two authors, first author plus *et al* is used (e.g.: Sealander *et al*, 1975).

The editor and publisher recommend that citation of online published papers and other material should be done via a DOI (digital object identifier), which all reputable online published material should have – see www.doi.org/ for more information. If an author cites anything which does not have a DOI they run the risk of the cited material not being traceable.

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Figures should be saved in a neutral data format such as TIFF or EPS. Powerpoint and Word graphics are unsuitable for reproduction. Please do not use any pixel-oriented programs. Photographs or drawings submitted for publication with the manuscript must be of high quality, distinct and well-focused, if they are to be suitable for reproduction. Scanned figures (only in TIFF format) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size. Please submit the data for figures in black and white. However, colour photos can be reproduced in black and white (with a possible loss of contrast).

Figures printed in colour are subject to an added charge. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, *Transboundary and Emerging Diseases* offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the

online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). Colour print charges are explained on the Colour Work Agreement Form. Colour Charges: It is the policy of *Transboundary and Emerging Diseases* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley Blackwell requires you to complete and return the Colour Work Agreement Form before your paper can be published. Any article received by Wiley Blackwell with colour artwork will not be published until the form has been returned. Please return the original signed form by post to the address below:

Customer Services (OPI) John Wiley & Sons Ltd, European Distribution Centre New Era Estate Oldlands Way Bognor Regis West Sussex PO22 9NQ

Colour graphics should be created using the RGB mode. There is a charge for alterations to figures when carried out by the publisher. Please note that figures will generally be reduced to fit within the column-width or the print area. This means that numbering and lettering must still be readable when reduced (e.g. maps) and that the scale might not correspond with the original (microscopic pictures), thereby invalidating references to scale in the text. If a figure is to be cropped, please mark the lines on a photocopy or tracing paper. Printouts should be made with a laser printer at the highest resolution (> 600 dpi). If artwork is to be scanned, line drawings should only be contour drawings without halftones (shades of grey). Please do not use patterns; rough hatching is possible.

Graphs with an x and y axis should not be enclosed in frames; only 2-dimensional representations. Do not forget the labels and units. Captions for the

figures should give a precise description of the content and should not be repeated within the figure.

Tables should be created using the table function. In the case of figures or tables taken from already published material, their source must be stated, and copyright waivers must be obtained.

Further information can be obtained at Wiley Blackwell Publishing's guidelines for figures:<http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp> Check your electronic artwork before submitting it:<http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

Figure & Table Legends: please ensure the essential information is within the first 60 characters of the captions to accommodate the online edition.

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publisher.

5.5. Supporting Information

Publication in electronic formats has created opportunities for adding details or whole sections in the electronic version only. Authors need to work closely with the editors in developing or using such new publication formats.

Supporting Information, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted.

It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Information is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Information is such that it cannot be

accommodated on the Journal's website, the author agrees to make the Supporting Information available free of charge on a permanent website, to which links will be set up from the Journal's website. The author must advise Wiley Blackwell Publishing if the URL of the website where the Supporting Information is located changes. The content of the Supporting Information must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of Supporting Information should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Information' and providing titles of figures, tables, etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the author's website cannot be reviewed. The Supporting Information is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.

Extra issues: Larger papers or monographs may be published as additional issues (numbered as the ordinary issues), the full cost being paid by the author. Further information may be obtained from the editor.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following website: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Proofs must be returned to the typesetter within three days of receipt. Please note that if you have registered for production tracking e-mail alerts in Author Services, there will be no e-mail for the proof corrections received stage. This will not affect e-mails alerts for any later production stages.

As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor.

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

Transboundary and Emerging Diseases is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or

page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

6.4 Author Material Archive Policy

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

6.5 Offprints and Extra Copies

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the

Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields:
offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&a

7. ONLINE OPEN

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://onlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.com/bauthor/onlineopen_order.asp Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

10. Curriculum vitae (Lattes)

Formação acadêmica/titulação

- 2012 Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Identificação dos tipos de papilomavírus bovino em tecido sanguíneo e em lesões cutâneas de bovinos afetados por papilomatose
Orientador: Dr Antonio Carlos de Freitas
Bolsista do(a): Capes/REUNI
- 2004 2006 Mestrado em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Estudo de cepas de Yersinia pestis isoladas durante epizootia no foco da Chapada do Araripe, Pernambuco, Brasil, Ano de obtenção: 2006
Orientador: Dra Alzira Maria Paiva de Almeida
- 2008 2012 Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 1999 2004 Graduação em Bacharelado Em Ciências Biológicas.
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
Título: Polimorfismo do gene da coagulase em Staphylococcus aureus isolados de infecção hospitalar Orientador: Dra. Nilma Cintra Leal

Formação complementar

- 2008 2008 Curso de curta duração em Excursões Didáticas no Ensino das Ciências. (Carga horária: 8h).
Associação Brasileira de Ensino da Biologia, SBENBIO, Brasil
- 2008 2008 Curso de curta duração em Formação do Projeto Travessia. (Carga horária: 40h).
Secretária de Educação do Estado de Pernambuco, SEDUC, Brasil
- 2003 2003 Curso de curta duração em Sensibilização e Informação em Biossegurança. (Carga horária: 15h).
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, CPQAM, Brasil
- 2003 2003 Curso de curta duração em Purificação de Proteínas por Cromatografia Líquida. (Carga horária: 10h).
Amersham Biosciences do Brasil LTDA, AMERSHAM, Brasil
- 2002 2002 Extensão universitária em V Curso Prático de Hematologia. (Carga horária: 60h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2002 2002 Extensão universitária em Fazendo Educação Ambiental. (Carga horária: 10h).
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
- 2001 2001 Curso de curta duração em Atualização em Bacteriologia Clínica. (Carga horária: 20h).
Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, SBACPE, Brasil
- 1997 1997 Curso de curta duração em Técnicas de Coleta de Sangue. (Carga horária: 3h).
Becton Dickinson, BD, Brasil

Atuação profissional

1. Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental LEMTE

Vínculo institucional

2014 Atual Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de doutorado

Carga horária: 40, Regime: Integral

2. Laboratório de Experimentação em Drosophila LED

Vínculo institucional

2010 2014 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Estágio voluntário,

Carga horária: 40 Regime: Integral

3. Secretária de Educação do Estado de Pernambuco SEDUC

Vínculo institucional

2012 2013 Vínculo: Professor temporário, Enquadramento funcional: Professor

Projeto Travessia, Carga horária: 200, Regime: Integral

4. Pentágono Colégio & Curso PCC

Vínculo institucional

2005 2012 Vínculo: Funcionário, Enquadramento funcional: Professor de

Biologia e Ciências, Carga horária: 44, Regime: Integral

5. Instituto Federal de Pernambuco IFPE

Vínculo institucional

2012 2012 Vínculo: Tutor a distância , Enquadramento funcional: Professor,
Carga horária: 10, Regime: Parcial

6. Escola Municipal Paulino Menelau EPM

Vínculo institucional 2008 2010 Vínculo: Professor, Enquadramento funcional:
Contrato temporário, Carga horária: 100, Regime: Integral

7. Escola Sonho Infantil ESI

Vínculo institucional 2009 2010 Vínculo: Professor de Ciências,
Enquadramento funcional: Professor, Carga horária: 30, Regime: Parcial

8. Yapoatam Colégio e Curso YCC

Vínculo institucional 2007 2007 Vínculo: Professor de Biologia
Enquadramento funcional: Professor, Carga horária: 20, Regime: Parcial

9. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães CPqAM

Vínculo institucional 2003 2006 Vínculo: Estágio,
Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Parcial

10. Centro Integrado de Ensino CIE

Vínculo institucional 2006 2006 Vínculo: Professor de Ciências
Enquadramento funcional: Professor, Carga horária: 30, Regime: Parcial

11. Laboratório de Análises Clínicas Adolfo Lutz Ltda LACAL

Vínculo institucional 1999 2000 Vínculo: Estagiário

Enquadramento funcional: Estágio, Carga horária: 20, Regime: Parcial
Atividades 02/1999 12/2000 *Estágio em análises clínicas nos setores de: Hematologia, Bioquímica, Parasitologia, Urinálise, Bacteriologia e Imunologia*

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. PESSOA JUNIOR, MORSE; SOUZA, GERLANE; SANTOS, SILVANA; BALBINO, TEREZA; LEAL, NILMA; OLIVEIRA, MARIA; ALMEIDA, ALZIRA

Relação genética entre as cepas de *Yersinia pestis* isoladas durante epizootia no foco da chapada do Araripe, Pernambuco, Brasil, por MLVA. **Revista da Biologia.** , v.11, p.7 13, 2014.

2. JUNIOR PESSOA, Morse Edson

Educação Ambiental na Escola. **Educação Ambiental em Ação.** , v.45, p.21 23, 2013.

3. RIEGER, T. T.; MONTE, E. S.; JUNIORPESSOA, Morse Edson; OLIVEIRA, D. L.; SANTOS, J. F.

New spontaneous wing mutant curly in *Drosophila willistoni* strain GdH4 **Drosophila Information Service.**V.96, p.222 225, 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. LIMA, A. P.; JUNIORPESSOA, Morse Edson; SILVA, A. M. S.; SANTOS, J. F.; RIEGER, T. T.

Genotoxic potential of Elixir Sanativo® medicinal product by smart in *Drosophila melanogaster* In: VIII Simpósio de Ecologia, Genética e Evolução de *Drosophila*, 2013, Ipojuca. Genotoxic potential of Elixir Sanativo® medicinal product by smart in *Drosophila melanogaster*. 2013.

2. JUNIORPESSOA, Morse Edson; SILVA, N. F.; GALDINO, S. L.; SANTOS, J. F.; RIEGGER, T. T.

Avaliação dos efeitos genéticos e biológicos em *Drosophila melanogaster* da biomolécula LPSF GQ16: uma glitazona utilizada no tratamento da diabetes mellitus tipo 2 In: II Jornada de Pós Graduação em Genética, 2012, Recife.

3. SOUZA, T. E.; JUNIORPESSOA, Morse Edson; LIMA, A. P.; SANTOS, J. F.; RIEGGER, T. T.

Drosophila melanogaster: um modelo de sucesso no ensino de genética na UFPE In: XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012, Petrolina.

4. JUNIORPESSOA, Morse Edson; VILELA, M. A.; LEAL, N. C.

Polimorfismo do gene da coagulase em *Staphylococcus aureus* isolados de infecção hospitalar In: I Congresso NorteNordeste de Multirresistência Bacteriana, I Simpósio NorteNordeste de Infecção Hospitalar e I Simpósio NorteNordeste de Controle da Qualidade dos Medicamentos, 2004, Olinda. I

Congresso Norte Nordeste de Multirresistência Bacteriana, I Simpósio Norte/Nordeste de Infecção Hospitalar e I Simpósio Norte/Nordeste de Controle da Qualidade dos Medicamentos. Recife: CGL Gráfica e Editora, 2004. p.5 93.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. JUNIORPESSOA, Morse Edson; SOUZA, G. T.; SANTOS, S.; BALBINO, T. C. L.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P.; OLIVEIRA, M. B. M.

Estudo de cepas de *Yersinia pestis* por Multiplex PCR isoladas durante epizootia no foco da Chapada do Araripe, Pernambuco, Brasil In: XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2012, Recife.

2. JUNIORPESSOA, Morse Edson; TRINDADE, R.

Modelagem do DNA como ferramenta didática para o ensino médio In: XII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2012, Recife.

3. JUNIORPESSOA, Morse Edson; LEAL, N. C.; SOUZA, G. T.; SANTOS, S.; BALBINO, T. C. L.; ALMEIDA, A. M. P.; OLIVEIRA, M. B. M.

Estudo de cepas de *Yersinia pestis* isoladas durante epizootia no foco da Chapada do Araripe, Pernambuco, Brasil In: XI Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão, 2011, Recife.

4. JUNIORPESSOA, Morse Edson; MONTE, E. S.; OLIVEIRA, D. L.; DURVAL, I. J. B.; SANTOS, F. I.; SANTOS, J. F.; RIEGGER, T. T.

Novo Fenótipo Mutante de *Drosophila willistoni* linhagem GDH41 In: XI Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão, 2011, Recife.

5. JUNIORPESSOA, Morse Edson; SIMOES, L. P. S.; MELO, A. L. F. D.; OLIVEIRA, G. L.; GUIMARAES, W. N. R.

Gimnosperma nos livros didáticos de ciências para o ensino fundamental In: X Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão, 2010, Recife.

Apresentação de trabalho e palestra

1. JUNIORPESSOA, Morse Edson

A Inserção de Jogos Pedagógicos e Atividades Lúdicas no Ensino da Educação Ambiental, 2013.

Participação em eventos

1. Avaliador na Feira Nordestina de Ciências e Tecnologia e Movimento Científico N/NE, 2013.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) VIII Simpósio de Ecologia Genética e Evolução de *Drosophila*, 2013. (Simpósio) Genotoxic potential of Elixir Sanativo® medicinal product by smart in *Drosophila melanogaster*.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) Semana Nacional de Ciência e Tecnologia, 2011. (Congresso) *Drosophila melanogaster*: A mosca que existe em nos.
4. Planejar: uma Utopia possível? 2010. (Oficina)
5. III Erebio NE, 2008. (Congresso)
6. Oficina Pedagógica Projeto Araribá Ciências, 2006. (Oficina)
7. III Congresso Internacional de Tecnologia na Educação, 2005. (Congresso)
8. Apresentação de Poster / Painel no I Congresso NorteNordeste de Multirresistência Bacteriana, I Simpósio Norte/Nordeste de Infecção Hospitalar e I Simpósio Norte/Nordeste de Controle da Qualidade dos Medicamentos, 2004.
9. I Workshop de Divulgação Científica, 2004. (Outra)
10. Seminário Aspectos epidemiológicos, microbiológicos e sociais relacionados à produção e ao consumo do leite, 2003. (Seminário)
11. Seminário Micotoxinas, 2003. (Seminário)
12. Simpósio Internacional, 2003. (Simpósio)

13. II Semana de Ecologia da UFRPE, 2002. (Encontro)

Participação em banca de trabalhos de conclusão Graduação

1. PESSOAJUNIOR, MORSE; RIEGER, T. T.; SANTOS, J. F.

Participação em banca de Ana Milena Souza da Silva. **Avaliação do Efeito Mutagênico da farinha do Maracujá (BRIFARM) (*Passiflora edulis Sims*) Pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART)** 2015. (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco.

2. SANTOS, J. F.; CARVALHO, M. W. P.; LEONI, N. M.; JUNIOR PESSOA, Morse Edson

Participação em banca de Luciana Feitosa de Souto. **Localização dos genes cópia única Sod e Hsp70 em *Drosophila immigrans***, 2012 (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco.

Participação em banca de comissões julgadoras Concurso público

1. Concurso Público Professor da Prefeitura de Ipojuca PE, 2013 Universidade de Pernambuco.