

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

NAYARA EVARISTO DE PONTES

**INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO
NUM REBANHO NORDESTINO E SUA POSSÍVEL TRANSMISSÃO
MATERNO-FETAL**

Recife

2020

NAYARA EVARISTO DE PONTES

**INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO
NUM REBANHO NORDESTINO E SUA POSSÍVEL TRANSMISSÃO
MATERNO-FETAL**

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

Área de concentração: Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas.

Coorientadora: Dra. Maria Angélica Ramos da Silva.

Recife

2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB4/1728

Pontes, Nayara Evaristo de

Investigação da diversidade do papilomavírus bovino num rebanho nordestino e sua possível transmissão materno-fetal / Nayara Evaristo de Pontes – 2022.

85 f. : il., fig., tab.

Orientador: Antônio Carlos de Freitas

Coorientadora: Maria Angélica Ramos Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Papilomavírus 2. Boi 3. Feto I. Freitas, Antônio Carlos de (orient). II. Silva, Maria Angélica Ramos (coorient.) III. Título.

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-183

NAYARA EVARISTO DE PONTES

**INVESTIGAÇÃO DA DIVERSIDADE DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO NUM
REBANHO NORDESTINO E SUA POSSÍVEL TRANSMISSÃO MATERNO-
FETAL**

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

Aprovado em 03/03/2020

BANCA EXAMINADORA

Dr. Antonio Carlos de Freitas (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jacinto da Silva Costa Neto (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel (Examinadora Externa)
Universidade Federal da Paraíba

Dr. Clara Nilce Barbosa (Examinadora Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico este trabalho a minha filha Débora Pontes, que seja uma pessoa honesta e dedicada aos seus objetivos e consiga alcançar suas metas.

AGRADECIMENTOS

Obrigada a todos que de certa forma me ajudaram neste trabalho.

Agradeço a Deus e familiares. Principalmente aos meus pais, mesmo sem muito estudo me apoiaram sempre, em todas as formas. Sem meus pais não teria chegado aqui. Agradeço às minhas tias, primas, primos, tios, sobrinho, irmão, cunhada, voinho, sogra. A todos meus amados de perto e de longe.

Agradeço a minha filha princesa por não me fazer desistir.

Agradeço a todos os meus professores, incluindo do nível infantil ao superior, em especial ao meu orientador Dr. Antonio Carlos (melhor orientador de todos), por toda orientação, apoio e paciência para comigo.

Agradeço aos meus colegas da inesquecível LB1 UFRPE, amo todos, em especial as minhas girls.

Aos meus colegas de mestrado e Doutorado especial e aos meus queridos do LEMTE-UFPE amo cada um visse.

Agradeço a UFPE por ter cedido toda a estrutura e oportunidade para a minha carreira acadêmica e aos órgãos de Fomento Capes e FACEPE por financiar meu projeto.

Aos queridos funcionários técnicos e terceirizados da UFPE.

Aos meus amigos e amigas em especial a Dani, Tacy, Cecília, Marquinhos e Elias.

Aos meus irmãos em Cristo por toda força e intercessão em especial ao meu líder Luiz Carlos e esposa. A minha queridíssima amiga-irmã Tarci por todo apoio.

A minha psicóloga Ângela por todo apoio e ajuda emocional, só ela sabe o que eu passei.

Agradeço aos meus líderes religiosos, meu pastor e missionários. Agradeço a todos de que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. E os que não me abandonaram no meio do caminho.

“Como é feliz o homem que acha a sabedoria, que obtém entendimento. Pois a sabedoria é mais proveitosa do que a prata e rende mais do que o ouro.” Provérbios 3.13-14

RESUMO

Atualmente existem 24 tipos de BPV descritos na literatura. O BPV é o agente etiológico da papilomatose bovina e causa grandes prejuízos ao gado, deterioração da aparência do animal, baixa na produção de carne bovina e leite. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de diversos tipos de BPV em sangue periférico, lesões cutâneas e tecidos reprodutivos, relacionando-os e buscando compreender melhor o mecanismo de disseminação viral no bovino. Foram obtidas amostras biológicas de 126 animais, dentre elas amostras de sangue, lesões de fêmeas bovinas, tecidos reprodutivos e feto. A extração de DNA e RNA foram realizadas e sucedeu a quantificação das amostras. As reações de PCR foram realizadas com primers específicos para BPV (BPV-1 ao 6, 8 ao 14), sendo 100 ng de *template*. Para as amostras de sangue bovino obtivemos o resultado, o BPV-12 com 94% (119/126), o BPV2 com 82% (103/126), o BPV-9 com 60% (75/126), o BPV-10 com 70% (88/126), o BPV-14 com 52% (66/126) e o BPV-1 com 47% (60/126) sendo considerados os mais prevalentes no sangue do rebanho investigado. Foi possível a detecção de 10 tipos virais em lesões cutâneas (-2,-4,-6,-8,-9,-10,-11,-12,-14), com prevalência de 100% (13/13) das amostras analisadas para os tipos BPV-2, -3, -10, -11 e -12. Foi realizada uma reação de expressão gênica no qual foi possível confirmar que o vírus estava expresso e não apenas presentes nas amostras analisadas. Podemos concluir que houve a detecção de expressão viral tanto na matriz como no feto. Portanto, sugerimos que a transmissão materno-fetal é uma característica dos BPVs.

Palavras-chave: Feto; BPV; Bovino; Transmissão

ABSTRACT

There are currently 24 types of BPV described in the literature. BPV is the etiological agent of bovine papillomatosis and causes great damage to cattle, deterioration of the animal's appearance, low production of beef and milk. Therefore, the aim of this study was to investigate the presence of different types of BPV in peripheral blood, skin lesions and reproductive tissues, relating them and seeking to better understand the mechanism of viral dissemination in cattle. Samples were obtained from 126 animals, including blood samples, lesions from bovine females, reproductive tissues and fetus. DNA and RNA extraction were performed and the samples were quantified. The PCR reactions were performed with specific primers for BPV (BPV-1 to 6, 8 to 14), with 100 ng of template. For bovine blood samples we obtained the result BPV-12 with 94% (119/126), BPV2 with 82% (103/126), BPV-9 with 60% (75/126), BPV-10 with 70% (88/126), BPV-14 with 52% (66/126) and BPV-1 with 47% (60/126) being considered the most prevalent in the blood of the investigated herd. It was possible to detect 10 viral types in skin lesions (-2, -4, -6, -8, -9, -10, -11, -12, -14), with a prevalence of 100% (13/13) of the samples analyzed for types BPV-2, -3, -10, -11 and -12. A gene expression reaction was carried out in which it was possible to confirm that the virus was expressed and not only present in the analyzed samples. We can conclude that viral expression was detected in both the matrix and

the fetus. Therefore, we suggest that maternal-fetal transmission is a characteristic of BPVs.

Keywords: Fetus; BPV; Bovine; Streaming

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Genoma do BPV com regiões gênicas.....	23
Figura 2 -	Ciclo Infecioso do Papilomavírus.....	24
Figura 3 -	Árvore filogenética do papilomavírus baseada no gene L1.....	25
Figura 4 -	Imagens ilustrativas de lesões e tumores de cânceres por BPV.....	26
Figura 5 -	Foto do bovino da raça Girolando.....	34
Figura 6 -	Gel representativo da PCR de BPV-2 com amostras de DNA.....	40
Quadro 1 -	Resultado das PCRs nas amostras de sangue (porcentagem).....	43
Figura 7 -	Gel representativo de BPV-2 nas amostras de lesão.....	43
Quadro 2-	Resultados das PCRs nas amostras de lesões cutâneas.....	45
Figura 8-	Gel representativo da PCR de BPV-3 nas amostras de fêmeas.....	48
Figura 9 -	Gel representativo da PCR de BPV-2 nas amostras fetais.....	49
Figura 10 -	Gel representativo de Mbl2 bovina de cDNA extraída.....	51
Figura 11-	Gel representativo da PCR de amostras de cDNA/primers E5BPV-2...	52
Figura 12-	Via de transmissão transplacentária.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência dos primers específicos buscando avaliar a presença dos tipos virais com fragmentos amplificados e temperatura de anelamento utilizados.....	38
Tabela 2- Relação de amostras de sangue bovino, com a numeração do laboratório.....	41
Tabela 3- Relação de amostras de lesão cutânea, com a numeração do laboratório.....	44
Tabela 4- Correlação da presença de BPV em sangue e lesão, de nove vacas.....	45
Tabela 5- Detecção e Genotipagem de BPV no trato reprodutor, sangue e lesões bovinas.....	48
Tabela 6 - Detecção e Genotipagem de BPV em sangue e lesão de vaca matriz.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPV	Papilomavírus bovino
β	Beta
LCR	Longa região de controle
ORF	Regiões abertas de leitura
pA	sítios de poliadenilação
pAE	sítio na região precoce
pAL	Sítio na região tardia
p53	Proteína p53
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pRB	Proteínas do Retinoblastoma
PV	Papilomavírus
RCA	Amplificação círculo rolante

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
	OBJETIVO.....	19
	1.1.1 Objetivo Geral	
	1.1.2 Objetivos Específicos	
2	Referencial Teórico.....	20
	2.1 Papilomavírus bovino	
	2.2 Oncoproteínas virais E5, E6 e E7	
	2.3 Ciclo viral do BPV	
	2.4 Diversidade viral	
	2.5 Doenças causadas pela infecção por BPV	
	2.6 Mecanismos de transmissão e/ou Disseminação do BPV	
3	ARTIGO.....	27
	O Papilomavírus bovino e sua transmissão transplacentária	
3.1	Material e Métodos.....	31
	OBTENÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	
	EXTRAÇÕES DE DNA E RNA	
	SÍNTESE DE CDNA	
	PCR para avaliação do controle de DNA E RNA	
	Reação de PCR	
	Ensaio de RT-PCR convencional para verificação da expressão gênica de BPV-2	
	Sequenciamento	
3.2	Resultados.....	37
	Resultados das PCRs das 126 fêmeas bovinas	
	Resultados das PCRs das oito fêmeas	
	Análise do RNA, cDNA e expressão de E5BPV-2	

3.3 Discussão.....52

4 CONCLUSÃO.....56

REFERÊNCIAS.....57

APÊNDICES.....64

APÊNDICE A - Artigo submetido à revista Archives of Virology

APÊNDICE B - Normas da Revista Archives of Virology

APÊNDICE C - Curriculum Vitae (Lattes)

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve um aumento na produção de carne bovina brasileira, e a exportação de carne *in natura* apresentou aumentos expressivos apenas em alguns países como China, Chile e alguns parceiros Sul-americanos, como Paraguai, Uruguai e Argentina (IBGE, 2018), em alguns como Hong Kong houve uma diminuição de exportações. Alguns fatores como as doenças infectocontagiosas 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).

Os papilomavírus bovinos (BPV) são vírus de DNA, dupla fita, com genoma de cerca de 8000 pb, que infectam os epitélios cutâneos e mucosos induzindo o desenvolvimento de lesões hiperplásicas no gado (Roperto *et al.*, 2019). O BPV é o agente etiológico da papilomatose, carcinomas e adenocarcinomas de bexiga urinária e trato digestório superior. Os tumores benignos e malignos causados pelo BPV são doenças emergentes importantes para o gado bovino e leiteiro no mundo (Roperto *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2013; Roperto *et al.*, 2019).

Os BPVs pertencem à família Papillomaviridae e 24 tipos de BPV (BPV-1 a 24) já foram relatados (<https://pave.niaid.nih.gov/>). Os BPVs estão classificados e caracterizados em cinco gêneros, Deltapapillomavirus, Xipapillomavirus, Epsilon-papillomavirus, Dyoxipapillomavirus, Dyokappapapillomavirus.

A infecção pelo 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).

A raça Girolando surgiu e proliferou espontaneamente no Brasil, pelo próprio ciclo biológico e evolutivo adaptada à ecologia tropical, seu habitat natural. Longevidade, fertilidade e precocidade estão bem evidentes no Girolando, virtudes herdadas do Gir e Holandês, resultando ótima produção vitalícia e uma progênie numerosa. As fêmeas dessa raça são as maiores produtoras de leite do Brasil. A vida produtiva se inicia normalmente aos 36 meses de idade (idade à 1ª cria), o pico de produção de leite chega até os 10 anos, e produz satisfatoriamente até aos 15 anos de idade (Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, 2017). Enquanto que a Nelore é a raça com cerca de 80% do rebanho nacional de corte.

Embora descritos como vírus epiteliotrópicos, esses têm sido encontrados em sangue e sítios não epiteliais, como leite, sangue, sêmen, urina e espermatozoides (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 coinfeção 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 BPV 1 e BPV2 foi detectada em uma mesma lesão (Yagui *et al.*, 2006, 2008, Lindsey *et al.*, 2009). No Brasil, utilizando *primers* específicos para os tipos de BPV, foi observada coinfeção por vários tipos de BPVs (Carvalho *et al.*, 2012, Santos *et al.*, 2014).

Cofatores como desnutrição, desequilíbrios hormonais, mutações e exposição prolongada à luz solar podem aumentar o risco de infecção por BPV, causando imunodeficiência (Hamad *et al.*, 2016).

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar a diversidade de papilomavírus bovinos presentes em diferentes tecidos do rebanho e sua possível transmissão transplacentária.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a presença dos tipos de BPV-1 ao BPV-14 em amostras de sangue e papilomas de bovinos afetados por papilomatose cutânea;
2. Investigar e avaliar a presença de BPV em tecidos reprodutivos da sua matriz e amostras fetais;
3. Relacionar a presença viral em lesões cutâneas e outros tecidos como sangue, tecidos reprodutivos e fetos.
4. Investigar a expressão viral do BPV, utilizando *primers* E5BPV-2.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

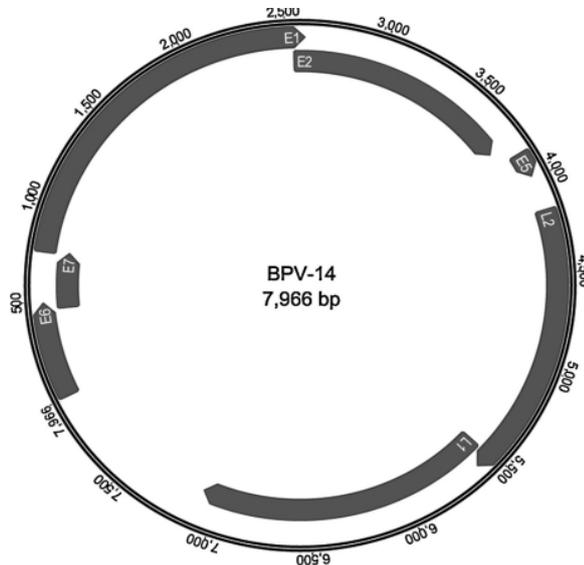
2.1 Papilomavírus bovino

Os Papilomavírus bovinos (BPVs) pertencem à família Papillomaviridae e 24 tipos de BPV (BPV-1 a 24) foram reportados até agora (<https://pave.niaid.nih.gov/>). O BPV anteriormente destacado como espécie-específico de bovinos, já foi relatado em equinos, ovinos, sarcóide felino, búfalos, girafas, zebras, entre outros hospedeiros (Bocaneti *et al.*, 2014; Munday *et al.*, 2015; Roperto *et al.*, 2018).

Todos os PV possuem genoma de DNA fita dupla circular, com tamanho aproximado de 8 Kb e peso molecular de cerca de $5,6 \times 10^2$ e pode ser dividido, em geral, em três principais regiões: precoce (E, do inglês early), tardia (L, de late) e longa região de controle (LCR, long control region). As três regiões são separadas por dois sítios de poliadenilação (pA): o sítio na região precoce (pAE) e outro na região tardia (pAL) (Zheng & Baker, 2006 apud Silva *et al.*, 2012). A informação genética está distribuída em pelo menos oito ORF no genoma dos papilomavírus (Figura 1).

Os genes de expressão precoce (E) codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA (E1 e E2), na transcrição (E2 e E4) e no processo de transformação celular (E5, E6 e E7). Os genes de expressão tardia (L) codificam as proteínas L1 e L2 que formam o capsídeo viral (Campo, 2006).

Figura 1 - Representação do Genoma do BPV-14 com as suas ORFs. (Fonte: Munday et al., 2015).



2.2 Oncoproteínas virais E5, E6 e E7

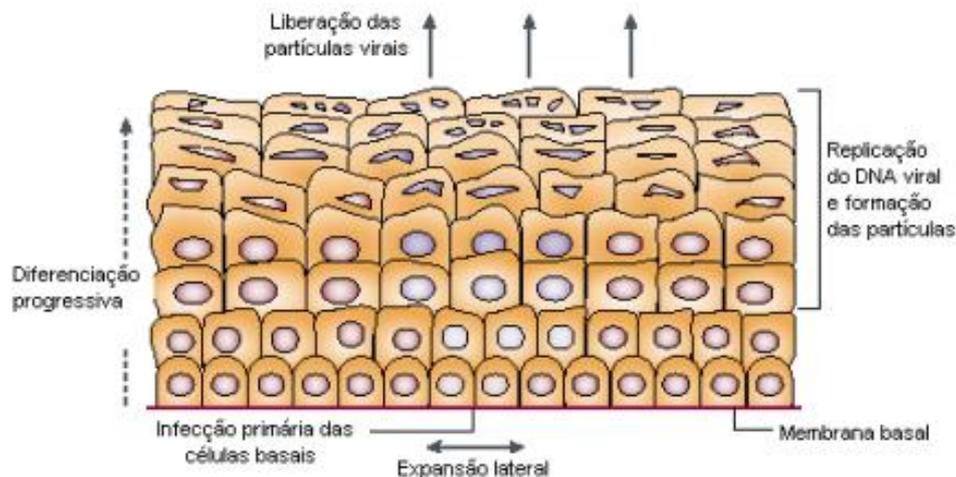
Três genes possuem atividade estimuladora da proliferação: E5, E6 e E7. E5 junto com E6 atuam na transformação celular. E7 tem um papel menor na transformação, mas é um regulador do número de cópias de BPV (Bogaert et al., 2007). E5 estimula o crescimento celular formando um complexo com o receptor do fator de crescimento epidérmico, o receptor fator de crescimento derivado de plaquetas β e o receptor do fator-1 estimulante de colônias. O E5 também demonstrou evitar a apoptose após danos no DNA (Roperto et al., 2008).

A ação oncogênica viral envolve a expressão de genes que codificam proteínas precoces (E6 e E7) dentro da célula hospedeira. Estas oncoproteínas interferem no controle do ciclo celular através de interação com proteínas celulares específicas, tais como a proteína 53 (p53) e a proteína do retinoblastoma (pRB) (Campo, 2006).

2.3 Ciclo viral do BPV

O ciclo infeccioso dos PV está intimamente ligado à diferenciação epitelial, uma vez que estes vírus se replicam no epitélio escamoso estratificado da pele e mucosas (Figura 2). A infecção requer a disponibilidade de uma célula da camada basal, ocorrendo geralmente em pequenas lesões de pele ou mucosa. A célula infectada se divide e a população se espalha lateralmente. Algumas progênes migram para as camadas celulares diferenciadas supra basais, onde os genes virais são ativados, o DNA viral é replicado e as proteínas do capsídeo são formadas. A formação de partículas virais ocorre e elas são liberadas na superfície e podem infectar tecidos adicionais (zur Hausen, 2002). Interessante que na célula bovina o DNA viral não se integra ao DNA do hospedeiro, mas necessita da maquinaria da célula para a sua replicação e sobrevivência.

Figura 2 - Ciclo infeccioso do Papilomavírus (zur Hausen, 2002).



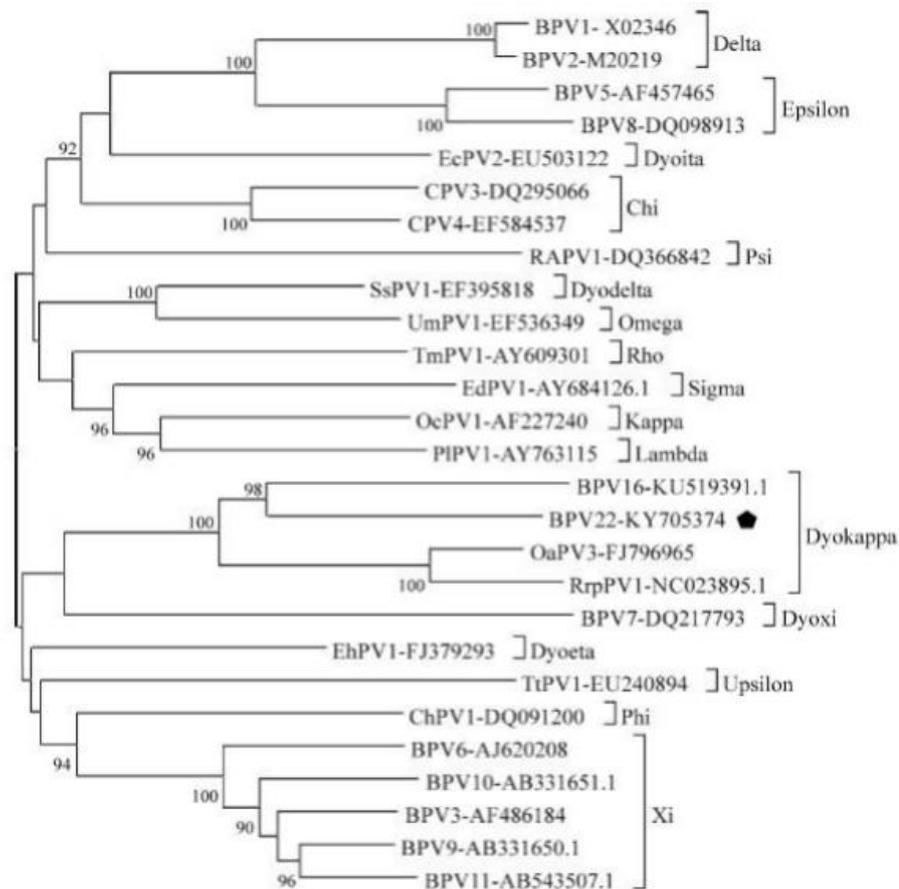
2.4 Diversidade viral

Os BPVs estão classificados e caracterizados em cinco gêneros, 24 tipos descritos, incluindo novos tipos e subtipos, sendo eles: Deltapapillomavirus (BPV-1,-2, -13 e -14); Xipapillomavirus (BPV-3, -4, -6, -9, -10, -11, -12, -15, -17 e -20); Epsilonpapillomavirus (BPV-5 e -8); Dyoxipapillomavirus (BPV-7);

Dyokappapapillomavirus (BPV -16, -18 e -22) (Figura 3). Os BPVs -19 e -21 ainda não foram classificados em nenhum gênero (Batista et al., 2013; Bauermann et al., 2017; Lunardi *et al.*, 2013; Munday et al., 2015; Roperto et al., 2018).

No nosso estudo fizemos a análise dos tipos virais mais frequentemente mencionados na literatura (BPV-1 ao BPV-14) (Fonte: Bauermann et al., 2017).

Figura 3 -Árvore filogenética do papilomavírus baseada no gene L1. (Fonte: Bauermann et al., 2017). Construir só a árvore de BPV



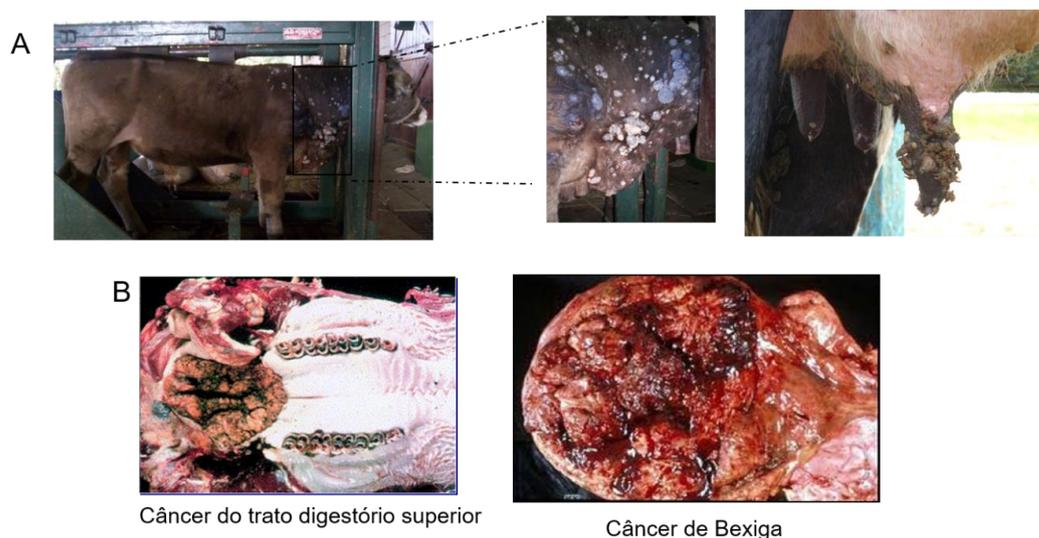
2.5 Doenças causadas pela infecção por BPV

2.5.1 Papilomatose bovina

A papilomatose bovina é uma doença causada pelo Papilomavírus bovino, que infecta os epitélios cutâneos e mucosos e que induzem lesões hiperplásicas (falar sobre a malignização) no gado (Figura 4a). Em geral os epitélios mucosos evoluem para as neoplasias (carcinomas e adenocarcinomas). A infecção por BPV também

pode evoluir para a neoplasia do trato gastrointestinal superior e da bexiga urinária (Figura 4b). Os tumores benignos e malignos causados pelo BPV são doenças emergentes importantes para o gado bovino e leiteiro no mundo (Freitas et al., 2011).

Figura 4 - Imagens ilustrativas de lesões cutâneas e tumores de cânceres causados pelo BPV.



2.5.2 Infecção pelo BPV e desenvolvimento de tumores

O BPV-1 causa fibropapilomas frondosos da pele das tetas e fibropapiloma peniano. O BPV-1 e BPV-2 causam fibropapiloma da pele, regiões anteriores e ventral do corpo, incluindo testa, pescoço e costas. As verrugas cutâneas causadas pelo BPV-2 são tipo couve-flor nas regiões anal, genital e ventral da pele abdominal. O BPV-3 causa papilomas cutâneos enquanto o BPV-4 com predileção do local para a parte superior da alimentação (Ugochukwu *et al.*, 2016). O BPV-2 também está associado ao câncer de bexiga urinário em bovinos e isso ocorre quando há uma associação sinérgica com a ingestão de samambaia (Borzacchiello & Roperto, 2008), também está associado a infecção do epitélio coriônico da placenta (Munday, 2014).

A infecção depende do protótipo viral e dos cofatores ambientais, causando sinais clínicos perturbadores em bovinos, como fibropapilomas cutâneos causados pelo BPV-1 e 2; câncer do trato gastrointestinal superior causado pelo BPV-4;

papilomatose de tetas e úbere causadas por BPV-1, -5, -6, -9 e -10; papilomatose do pênis causada por BPV-1; câncer da bexiga urinária causada por BPV-1 e 2; e papilomas cutâneos causados por BPV-8 (Borzacchiello e Roperto 2008; Tozato et al. 2013).

A papilomatose persistente das tetas nas vacas pode levar à mastite, impedindo a amamentação dos bezerros e impossibilitando a ordenha (Campo, 2002). Os papilomas da teta parecem pedunculados e são chamados fibropapillomas de grãos de arroz (Borzacchiello e Roperto 2008). A infecção por BPV-1 leva a fibropapiloma do pênis; isso ocorre nos epitélios peniano e prepucial e pode se espalhar ao longo do períneo, podendo se tornar necrótico e levar à esterilidade (Campo, 2006).

Em bovinos saudáveis, os papilomas são poucos e normalmente regredem após um ano. Porém em animais imunossuprimidos, a regressão não ocorre e os papilomas se espalham para outros locais (Campo, 2006). A imunossupressão crônica em bovinos geralmente resulta da exposição a produtos químicos imunossupressores, como presentes na samambaia (Campo, 2006 *apud* Ugochukwu *et al.*, 2016).

2.6 Mecanismos de transmissão e/ou Disseminação do BPV

Embora os Papilomavírus sejam descritos classicamente como epiteliotrópicos, a atividade destes vírus já foi verificada em sangue e sêmen de bovinos (Carvalho & Stocco, 2009; Silva et al., 2013). A sua presença já foi relatada em fluidos como plasma sanguíneo, leite e colostro (Freitas et al., 2003; Freitas et al., 2007).

O material genético do BPV foi identificado no trato reprodutivo, tecidos embrionários e gametas em um mesmo animal e no sangue periférico de sua prole (Yagui et al. 2009). Já foi sugerido que o sangue possa atuar como um caminho para a disseminação de papilomavírus para outros tecidos e fluidos corporais, em especial para o aparelho reprodutivo e gametas, levando a considerações

importantes sobre a disseminação de doenças relacionadas à BPV e inseminação artificial e transferência de embriões (Freitas et al., 2007).

Em sangue e placenta de éguas saudáveis e sangue da prole foi detectada a presença do DNA do BPV-1 e -2, corroborando com a possível transmissão vertical do vírus (Savini et al., 2019).

O Brasil sendo o maior produtor de carne e leite bovino, tem se deparado com situações como infecções e doenças nos animais que prejudicam a ordenha, a produção de leite, a deterioração da carne e depreciação do couro. Visto que alguns animais ficam com lesões tão severas que impossibilita a sua comercialização. Por isso é muito importante o estudo dessas viroses, incluindo o Papilomavírus bovino.

3 ARTIGO

O Papilomavírus bovino e sua transmissão transplacentária

N.E. Pontes¹, M. E. Junior-Pessoa¹, Tibúrcio Jr, E.¹, P.G. Carrazzoni², M.A.R. da Silva³, Andrade, M.A.S.¹, Silva, A.M.S.¹, A.C. de Freitas¹

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

² Instituto Agrônômico de Pernambuco, Recife, Brasil.

³ Instituto Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

RESUMO

Atualmente existem 24 tipos de BPV descritos na literatura. O BPV é o agente etiológico da papilomatose bovina e causa grandes prejuízos ao gado, deterioração da aparência do animal, baixa na produção de carne bovina e leite. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença de diversos tipos de BPV em sangue periférico, lesões cutâneas e tecidos reprodutivos, relacionando-os e buscando compreender melhor o mecanismo de disseminação viral no bovino. Foram obtidas amostras biológicas de 126 animais, dentre elas amostras de sangue, lesões de fêmeas bovinas, tecidos reprodutivos e fetos. A extração de DNA e RNA foram realizadas e sucedeu a quantificação das amostras. As reações de PCR foram realizadas com primers específicos para BPV (BPV-1 ao 6, 8 ao 14), sendo 100 ng de *template*. Para as amostras de sangue bovino obtivemos o resultado, o BPV-12 com 94% (119/126), o BPV2 com 82% (103/126), o BPV-9 com 60% (75/126), o BPV-10 com 70% (88/126), o BPV-14 com 52% (66/126) e o BPV-1 com 47% (60/126) sendo considerados os mais prevalentes no sangue do rebanho investigado. Foi possível a detecção de 10 tipos virais em lesões cutâneas (-2,-4,-6,-8,-9,-10,-11,-12,-14), com prevalência de 100% (13/13) das amostras analisadas para os tipos BPV-2, -3, -10, -11 e -12. Foi realizada uma reação de expressão gênica no qual foi possível confirmar que o vírus estava expresso e não apenas presentes nas amostras analisadas. Podemos concluir que houve a detecção de expressão viral tanto na matriz como no feto. Portanto, sugerimos que a transmissão materno-fetal é uma característica dos BPVs.

Palavras-chave: Feto; BPV; Bovino; Transmissão; Vertical.

Introdução

Segundo o IBGE, o abate de 296,51 mil cabeças de bovinos a mais no 2º trimestre de 2018 em relação ao mesmo período do ano anterior, foi impulsionado por aumentos em 15 das 27 Unidades da Federação (UFs). 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).

Os papilomavírus bovinos (BPV) são vírus de DNA, dupla fita, com genoma de cerca de 8000 pb, que infectam os epitélios cutâneos e mucosos induzindo o desenvolvimento de lesões hiperplásicas no gado (Roperto *et al.*, 2019). O BPV é o agente etiológico da papilomatose e câncer bexiga e trato digestório superior. Os tumores benignos e malignos causados pelo BPV são doenças endêmicas importantes para o gado bovino e leiteiro no mundo (Freitas *et al.*, 2013; Roperto *et al.*, 2012; Roperto *et al.*, 2019).

Os BPVs pertencem à família Papillomaviridae e 24 tipos de BPV (BPV-1 a 24) já foram relatados (<https://pave.niaid.nih.gov/>). Os BPVs estão classificados e caracterizados em cinco gêneros, Deltapapillomavirus, Papillomavirus, Epsilonpapillomavirus, Dyoxipapillomavirus, Dyokappapapillomavirus.

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 coinfeção 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 BPV-1 e BPV-2 foi detectada em uma mesma lesão (Yagui *et al.*, 2006, 2008, Lindsey *et al.*, 2009). No Brasil, utilizando *primers* específicos para os tipos de BPV, foi observada coinfeção por vários tipos de BPVs (Carvalho *et al.*, 2012, Santos *et al.*, 2014).

O progresso da infecção está relacionado com a deficiência imunológica do hospedeiro. Condições estressantes podem levar a uma baixa da imunidade facilitando o surgimento da doença (Silva *et al.*, 2014).

Os objetivos deste trabalho foram: caracterizar os bovinos quanto à infecção por BPV, analisar a presença de coinfeções em lesões cutâneas e em tecido sanguíneo; como também investigar a presença dos BPVs em lesões, sangue e tecidos reprodutivos de fêmeas bovinas e feto bovino (animais que foram ao abate), relacionando e buscando compreender melhor a transmissão materno-fetal, e os mecanismos de disseminação viral no bovino.

3 1 Material e Métodos

3.1.1 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O projeto para realização deste estudo foi encaminhado para apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, com número de protocolo N°23082.013040/2015-49.

A propriedade do IPA – Instituto Agrônômico de Pernambuco – Estação Experimental de Itambé (EEI), possui 138 bovinos da raça Girolando 5/8 (Figura 5). Desses obtivemos amostras de 126 animais, sendo elas amostras de sangue, e 39 destes animais tinham lesões cutâneas pelo seu corpo, de leve a grave. Então foi possível a obtenção de 13/39 (1/3) de amostras de papilomas do rebanho de 126 fêmeas bovinas.

O IPA-PE com uma área de 240 ha, distante do Recife (PE) 102 km foi avaliado quanto a presença viral. Sendo selecionados 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 (*Pennisetum purpureum*), água e sal mineral comercial específico para bovinos, *ad libitum*, apresentando ou não lesões cutâneas.

Posteriormente foram obtidas amostras de abatedouro de oito fêmeas que foram ao abate, 25 amostras sendo 11 de tecidos reprodutivos (placenta, ovário e útero), oito de sangue e seis de tecido fetal (sangue e pele). Todas as amostras seguiram para o laboratório para processamento. Todas as coletas foram realizadas por profissional capacitado do IPA-PE.

Figura 5 - Foto de bovino na raça Girolando.



3.1.2 EXTRAÇÕES DE DNA E RNA

EXTRAÇÃO DE SANGUE: Seguiu-se o protocolo manual de Fenol-clorofórmio (Davis et al., 1986).

EXTRAÇÃO DE LESÃO CUTÂNEA E TECIDOS REPRODUTIVOS: Seguiu-se as instruções do protocolo do Qiagen® DNA Mini Kit – Promega e parte do protocolo manual de Trizol. Inicialmente foi pesado 30 mg de biópsia e acrescentado a ela nitrogênio líquido até sua masseração. Após isso foi sendo adicionado trizol e transferido para um tubo de 1,5 ml e incubado a temperatura ambiente. Adicionado clorofórmio para ocorrer separação do DNA e RNA para posterior purificação pelo kit. A fase aquosa (RNA) é transferida para um tubo de 1,5 ml, e a membrana intermediária (DNA) transferida para outro tubo e o restante líquido descartado. Após isso seguiu-se o protocolo de extração pelo kit de DNA e de RNA da Qiagen.

Logo em seguida o DNA extraído foi quantificado com o auxílio do equipamento NanoVue (GE, Alemanha).

3.1.3 SÍNTESE DE CDNA

Após a extração do RNA de acordo com o RNeasy Mini Kit , se seguiu para a síntese do cDNA. Selecionamos 12 amostras embebidas no RNA lather, que foram previamente constatadas positivas para o DNA do BPV-2, incluindo representantes dos tecidos de lesão, placenta, ovário e útero de vacas matrizes, e também amostra de pele fetal. Todas analisadas para a expressão gênica do oncogene E5 de BPV-2.

As amostras de RNA foram tratadas com a enzima RNase-free DNase (Promega, EUA) antes de proceder à síntese do cDNA. Para a produção da primeira fita de cDNA, foram utilizados Oligo (dT) 15 Primer (Promega, EUA) e a enzima ImProm-II *Reverse Transcriptase* (Promega, EUA) em uma reação com volume final de 20µL. Foram utilizados dois controles negativos, um sem a adição da transcriptase reversa, com os demais reagentes, e outro sem a adição do RNA (controle sem template).

3.1.4 PCR para avaliação do controle de DNA E RNA

Para a PCR de avaliação da qualidade do DNA extraído, utilizou-se primers endógeno bovino, gene da beta-globina bovina (beta globina: F-5' AACCTCTTTGTTCAACAACCG-3', R-5' CAGATGCTTAACCCACTGAC-3'), amplificando um fragmento de 400 pb.

Para o RNA utilizou-se primers endógeno Mbl2 bovina para avaliar a qualidade do cDNA. Par de primers Mbl2: F-5' (F:TAATCTCCCTTGACCTTTCTTACACC; R:AGAACAGCCCAAAGTGT, fragmento de 247 pb (Wang *et al.*, 2012).

3.1.5 Reação de PCR

As reações de PCR seguiram com cerca de 100 ng de DNA foram utilizados para a análise por PCR utilizando o kit de reagentes Master mix (Promega, USA). A detecção dos tipos específicos de BPV foi realizada com primers específicos descritos na literatura sendo do BPV-1 ao -6, -8 ao -14 (Silva *et al.*, 2012 com modificações; Lunardi *et al.*, 2013; Munday *et al.*, 2015), que anelam na região L1 do genoma viral (Tabela 1). Os produtos de amplificação (10 µL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE, corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e foto documentada.

Tabela 1 - Sequência dos *primers* específicos buscando avaliar a presença dos tipos virais com seus respectivos fragmentos amplificados e temperatura de anelamento utilizados.

Primers	Sequência	Fragmento amplificado	Temperatura de anelamento
BPV1	BPV1 F - GGA GCG CCT GCT AAC TAT AGG BPV1 R - ATC TGT TGT TTG GGT GGT GAC	301 pb	68°C
BPV2	BPV2 F - GTT ATA CCA CCC AAA GAA GAC CCT BPV2 R - CTG GTT GCA ACA GCT CTC TTT CTC	164 pb	58°C
BPV3	BPV3 F - CAG TCA ATT GCA ACT AGA TGC C BPV3 R - GGC TGC TAC TTT CAA AAG TGA	216 pb	60°C
BPV4	BPV4 F - GCT GAC CTT CCA GTC TTA AT BPV4 R - CAG TTT CAA TCT CCT CTT CA	170 pb	60°C
BPV5	BPV5 F - GGC ATG TAG AGG AAT ATA AGC BPV5 R - TTC TCT GAG ATC AAT ATT CC	262 pb	60°C
BPV6	BPV6 F - TTA GAG ACC TGG AAC TTG GG 3' BPV6 R - TAC GCT TTG GCG CTT TTT TGC 3'	260 pb	65° C

BPV8	BPV8 F - 5' TAGAGGACACATACCGCTTCCAAAGC 3' BPV8 R - 5' TTTGCAGCACTGCAGGTGATCCC 3'	196 pb	60°C
BPV9	BPV9 F - 5' AAAGAGCAAATCGGGAGCACC 3' BPV9 R - 5' AACTAATGACCCACTAGGGCTCC 3'	264 pb	60°C
BPV10	BPV10 F - 5' AAGGCATTTGTGGTCTCGAGG 3' BPV10 R - 5' CTAAAGAACCACTTGGAGTGCC 3'	148 pb	60°C
BPV11	BPV11 F - TGCAGACTCAACCAGGAG 3' BPV11 R - CCATAAGGGTTCGTTGCTCAT 3'	200 pb	57°C
BPV12	BPV12 F - AAAGCTGAACCATGCAAACC 3' BPV12R - TAACAATGTCAAGGGGCACA 3'	200 pb	54°C
BPV13	BPV13 L1 F 5-GCCACA CCATTGACCTCTA-3 BPV13 L1 R 5-GCCAGCAA AGCGATTATTC-3	250 pb	54°C
BPV14	BPV14L1F 5- CCTCCAACACCTGTGTCTAAGG BPV14L1R 5- ATCAGTTACACAAGGACGTGC	500 pb	58° C

3.1.6

Ensaio

de RT-PCR convencional para verificação da expressão gênica de BPV-2

Seguiu-se o protocolo de reação de PCR descrito acima modificando apenas o *template* utilizado nesse caso o cDNA, e os primers utilizados foram de E5BPV-2 oncogene viral, fragmento esperado de 153 pb.

3.1.7 Sequenciamento

Os *amplicons* dos tipos de BPV mais prevalentes foram sequenciados usando o kit ABI PRISM BigDye® Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os primers usados para sequenciamento foram dos tipos BPV-2, BPV-9 e BPV-14 (tipos mais frequentes). As sequências obtidas foram analisadas pelos programas BioEdit Sequence Alignment Editor (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html) e BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

3 2 Resultados

Para os 126 animais analisados obtivemos positividade para todos animais. A coinfeccção foi bem prevalente (125/126), apenas um animal estava infectado com um único tipo viral, animal 115, infectado com o BPV-12, tipo mais prevalente nesse rebanho. Os animais foram negativos apenas para os tipos BPV-5 e BPV-13.

3.2.1. Resultados das PCRs das 126 fêmeas bovinas

Para as 126 fêmeas bovinas, obtivemos resultados das amostras de sangue, (Figura 6, Tabela 2), encontramos os tipos virais: BPV-12 com 94% (119/126), BPV2 com 82% (103/126), BPV-9 com 60% (75/126), BPV-10 com 70% (88/126), BPV-14 com 52% (66/126) e BPV-1 com prevalência de 47% (60/126) mais prevalentes no sangue do rebanho investigado (Quadro 1). O BPV-3, -4 e -6 tiveram pouca prevalência no sangue. Os BPV-s -5, -8 e -13 não foram detectados nas amostras sanguíneas. Houve coinfeccção de até sete tipos virais por amostra. Houve uma amostra que apresentou apenas um tipo viral. (dados de coinfeccção quais tipos mais coinfectados).

Para a análise das lesões bovinas, obtivemos também resultados positivos (Figura 7, Tabela 3). Foi possível a detecção de 10 tipos virais em lesões cutâneas (-2,-4,-6,-8,-9,-10,-11,-12,-14), com prevalência de 100% (13/13) das amostras analisadas para os tipos BPV-2, -3, -10, -11 e -12. Para BPV-4 observou-se uma prevalência de 85% (11/13) em lesões cutâneas, diferente do sangue que teve baixa prevalência. Para o BPV-9 foi de 46% em lesões. Em amostras de lesões foi possível a detecção de BPV-8 (77% - 10/13), BPV-6 (70% - 9/13) e o menos frequente foi o BPV-14 (15% - 2/13) (Quadro 2). O BPV-14 teve uma frequência geral de 67% somando sangue e lesões.

Não houve a identificação do BPV-1 em lesões cutâneas, ao passo que para o sangue houve uma razoável presença de BPV-1. Nas lesões observamos a coinfeccção de até 10 tipos virais na mesma amostra.

Fizemos uma correlação das amostras de sangue e lesões buscando verificar quais tipos virais circulam no animal (Tabela 4). No sangue observamos uma coinfeção de no mínimo 2 tipos por amostra e máximo de 7 tipos virais por amostra (com exceção de uma amostra, que foram nove tipos detectados), porém nas lesões observamos no mínimo seis e máximo 10 por amostra. Podemos observar uma maior coinfeção em lesões.

Com relação ao BPV-14 podemos verificar uma maior prevalência no sangue do que nas lesões. O BPV-2 e -12 foram mais frequentes tanto no sangue como em lesões.

Figura 6 - Gel representativo da PCR de BPV-2 em amostras de DNA de sangue bovino. C- Controle negativo de reação; M: Marcador de 50pb; amostras 90 (001) - 99 (1904E) amostras de DNA; C+ Controle positivo de BPV-2.

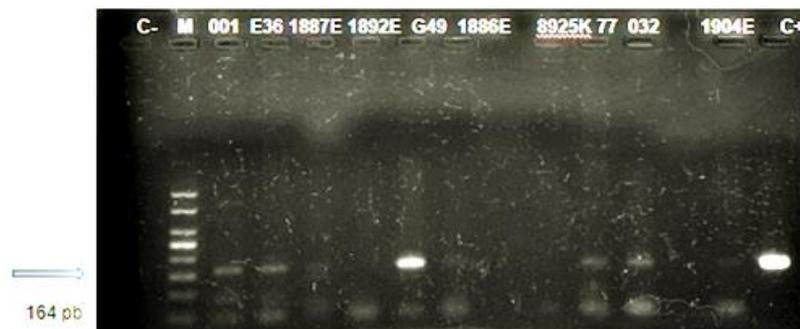


Tabela 2: Relação de amostras de sangue bovino, com a numeração do LEMTE, tipos de BPV, quantidade de BPVs por amostra. Legenda: LEMTE – Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, BPV – Papilomavírus bovino.

Número LEMTE	Tipos de BPVs	Quantidade de BPVs por amostra
1	2,9,10,12	4
2	2,4,6,9,10,12	6
3	2,6,9,10,12	5
4	2,9,10,12	4
5	2,9,10,12	4

6	2,9,10,12	4
7	2,9,10,12	4
8	1,2,9,10,12	5
9	1,2,9,10,12	5
10	1,2,4,9,10,12	6
11	1,2,6,9,10,12	6
12	1,2,6,9,10,12	6
13	1,2,6,9,10,11,12	7
14	1,2,6,9,10,11,12	7
15	1,2,6,9,10,11,12	7
16	1,2,9,10,11,12,14	6
17	1,2,4,9,10,12,14	6
18	1,2,9,10,11,12,14	6
19	1,2,9,10,12,14	5
20	1,2,9,10,11,12,14	6
21	1,2,9,10,12,14	5
22	1,2,9,10,12,14	5
23	1,2,10,12,14	4
24	1,2,9,10,12,14	5
25	1,2,9,10,11,12,14	6
26	1,2,9,10,11,12,14	6
27	1,2,9,10,11,12,14	6
28	1,2,9,10,11,12,14	6
29	1,2,4,6,9,10,11,12,14	8
30	1,2,9,10,11,12,14	6
31	2,3,9,10,12,14	5
32	2,9,10,12,14	4
33	1,2,9,10,12,14	5
34	1,2,9,10,14	4
35	1,2,4,9,10,12,14	6
36	2,9,10,12,14	4
	2,3,4,6, 8,9,10,11,12,14	9
37	1,2,9,10,14	4
38	1,2,9,10,12,14	5
39	1,2,9,10,11,12,14	6
40	1,2,9,10,12,14	5
41	1,2,9,10,12,14	5
42	1,2,9,10,12,14	5
43	1,2,9,10,12,14	5
44	1,2,4,9,10,14	5

45	1,2,9,10,12,14	5
46	1,2,9,10,12,14	5
47	1,2,9,10,11,12,14	6
48	2,9,10,12,14	4
49	1,2,9,10,12,14	5
50	1,2,9,10,12,14	5
51	2,9,10,12	4
	2,3,4,6,8,9,10,11,12	9
52	2,9,10,12,14	4
53	2,9,10,12,14	4
	2,9,10,12,14	4
54		
	2,3,4,6,10,11,12	7
55	1,2,4,9,10,12,14	6
	2,3,4,6,8,10,11,12	8
56	1,2,9,10,12	5
57	1,2,9,10,12,14	5
58	2,9,10,12,14	4
59	1,2,9,10,12,14	5
	2,3,4,6,8,11,12	7
60	1,9,10,11,12,14	5
61	1,9,12	3
62	1,2,9,10,12	5
63	2,9,10,12,14	4
64	10,12,14	2
65	2,10,12,14	3
66	1,2,9,10,12	5
67	1,2	2
68	1,2,9,10,12	5
69	1,9,10,12	4
70	1,2,10,12	4
	2,3,4,6,10,11,12	7
71	2,10,12	3
72	1,2,10	3
73	10,12,14	2
	2,3,6,8,9,10,11,12	8
74	1,9,10,12	4

75	2,9,10,12,14	4
76	2,9,10,12,14	4
	2,3,4,6,8, 9,10,11,12,14	9
77	2,9,10,11,12,14	5
78	2,9,10,12	4
	2,9,10,12	
79		4
80	1,2,9,10,12,14	5
81	1,9,10,12,14	4
82	1,2,9,10,12,14	5
83	1,2,9,10,12,14	5
84	10,14	2
85	1,2,10,12,14	4
86	9,10,12,14	3
87	2,9,10,11	4
88	1,2,9,10,11,12,14	6
89	9,10,12	3
90	2,3,11,12	4
91	2,12	2
92	2,12,14	3
93	11,12	2
95	2,11,12	3
96	11,12	2
97	2,11,14	3
98	2,12	2
99	2,12,14	3
100	2,12	2
101	2,11,12	3
102	2,11,12	3
103	2,12	3
104	2,12	3
105	2,12	3
106	11,12	2
107	2,6,11,12	4
108	2,11,12	3
109	2,6,11,12,14	5

110	6,12	2
111	3,6,11,12	4
112	2,11,12	3
113	2,11,12	3
114	11,12,14	3
115	12	1
116	11,12	2
117	2,6,11,12	4
118	11,12	2
119	11,12	2
120	6,11,12,14	4
121	6,11,12	3
122	2,10,12	3
123	2,11,12	3
124	11,12	2
125	6,11,12	3
126	11,12	2

Quadro 1: Resultado das PCRS nas amostras sanguíneas (EM PORCENTAGEM).

BPV-12	94%
BPV-2	82%
BPV-10	70%
BPV-9	60%
BPV-14	52%
BPV-1	47%

Figura 7 - Gel representativo de BPV-2 nas amostras de lesão. C- Controle negativo; M: Marcador 100 pb; controle amostra positiva; 1-6 amostras de lesão.

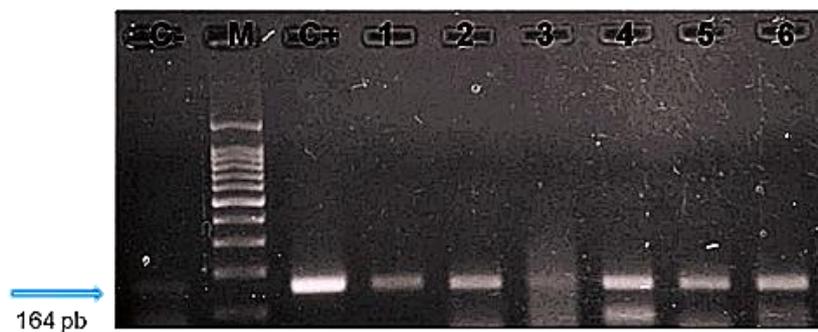


Tabela 3 - Relação de amostras de lesão cutânea, com a numeração do LEMTE, tipos de BPV, quantidade de BPVs por amostra. LEMTE – Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, BPV – Papilomavírus bovino.

Numeração	Tipos de BPV	Quantidade de BPV por amostra
G47	2,3,8,10,11,12	6
G41	2,3,4,6,8,9,10,11,12	9
G58	2,3,4,6,8,10,11,12	8
76	2,3,4,6,8,9,10,11,12,14	10
70	2,3,4,6,10,11,12	7
52	2,3,4,6,9,10,11,12	8
36	2,3,4,8,9,10,11,12,14	9

38	2,3,4,6,8,9,10,11,12	9
73	2,3,6,8,9,10,11,12	8
51	2,3,4,6,8,9,10,11,12	9
22	2,3,4,6,8,10,11,12	8
55	2,3,4,6,8,10,11,12	8
54	2,3,4,6,10,11,12	7

Quadro 2 - Resultados das PCRs nas amostras de lesões cutâneas (em porcentagem).

BPV-2	100%
BPV-3	100%
BPV-10	100%
BPV-11	100%
BPV-12	100%
BPV-4	85%
BPV-8	77%
BPV-6	70%
BPV-9	46%
BPV-14	15%

Tabela 4 - Achado da presença de BPV em sangue e lesão, de nove fêmeas bovinas.

Amostras	Tecidos	Identificação	Idade	Genotipagem BPV
Fêmea	Lesão	36	4	2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14
	Sangue			2, 9, 10, 12, 14
Fêmea	Lesão	51	5	2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12
	Sangue			2, 9, 10, 12
Fêmea	Lesão	59		2, 3, 4, 6, 8, 11, 12
	Sangue			1, 2, 9, 10, 12, 14
Fêmea	Lesão	73	5	2, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12
	Sangue			2, 10, 12, 14
Fêmea	Lesão	70	4	1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 11, 12
	Sangue			1, 2, 9, 10, 12
Fêmea	Lesão	55	8	2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12
	Sangue			1, 2, 4, 9, 10, 12, 14
Fêmea	Lesão	54		2, 3, 4, 6, 10, 11, 12
	Sangue			2, 9, 10, 12, 14
Fêmea	Lesão	79		2, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12
	Sangue			2, 9, 10, 12
Fêmea	Lesão	76	3	2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14
	Sangue			2, 9, 10, 12, 14

3.2.2 Resultados das PCRs das oito fêmeas

Para as fêmeas que foram ao abate, obtivemos resultados positivos para os animais sem prenhez (cinco fêmeas) e animais com prenhes (três fêmeas), respectivamente (Figura 8 e 9, Tabela 5 e 6). Podemos observar que os tipos mais prevalentes foram -2, -3 e -9 nos tecidos reprodutivos (útero e ovário) e bexiga desse grupo (Tabela 5).

Outro ponto importante é com relação às amostras de sangue de feto tem uma correspondência entre os tipos presentes na fêmea bovina e no feto, tipos encontrados no sangue fetal BPV-2, -9, -10, -12 e -14. Com relação às lesões cutâneas e pele de feto obtivemos a correspondência dos tipos -2, -9, -14 (Tabela 6). Nas lesões observamos a prevalência de BPV-3, no entanto no sangue houve a ausência desse tipo viral neste grupo amostral. O BPV-4 foi pouco prevalente em sangue e bem prevalente em lesão (Tabela 5).

Foram investigadas três amostras de placenta, sendo uma amostra negativa; outras duas positivas, sendo para o tipos -2, -3, -9, -11 e -12 e outra amostra de placenta para os tipos -8 e -12 (Tabela 6).

Figura 8 - Gel representativo da PCR de BPV-3 nas amostras de DNA extraídas de animais oriundos de abatedouro (amostras de fêmeas bovinas). C- Controle negativo de reação; M: Marcador de peso molecular de 100pb; 14-24, amostras de DNA de bexiga, placenta, ovário e útero de DNA.



Tabela 5 - Detecção e Genotipagem de BPV no trato reprodutor (ovário e útero), de sangue e lesão de vacas não prenhes (cinco fêmeas).

Amostras de DNA	Tecidos	Genotipagem
Tecidos		BPV
92**	Sangue	2, 12, 14
	Útero	-
	Ovário	-
	Bexiga	3
55	Lesão	2, 3, 4, 6, 8, 9, 10,11, 12
	Sangue	1,2,4,9,10,12, 14
	Útero	-
	Ovário	3,9
	Bexiga	3,12
73	Lesão	2, 3, 6, 8, 9, 10, 11, 12
	Sangue	

	Útero	2, 10, 12, 14
	Bexiga	9
		-
62**	Sangue	1, 2, 9 10, 12
	Útero	3, 11
	Ovário	2, 3
	Bexiga	1,3, 9
70	Lesão	2, 3, 4, 6, 10, 11, 12
	Sangue	2, 9, 10, 12
	Útero	3, 9
	Ovário	9
		-
	Bexiga	

**Não houve quantidade de lesão suficiente para a coleta.

Figura 9 - Gel representativo da PCR de BPV-2 nas amostras de DNA extraídas de animais oriundos de abatedouro (amostras fetais). C- Controle negativo de reação; M: Marcador de peso molecular de 100pb; 33-40 amostras de DNA de pele, fígado, ovário e útero de fêmeas fetais. C + clone de BPV-2.

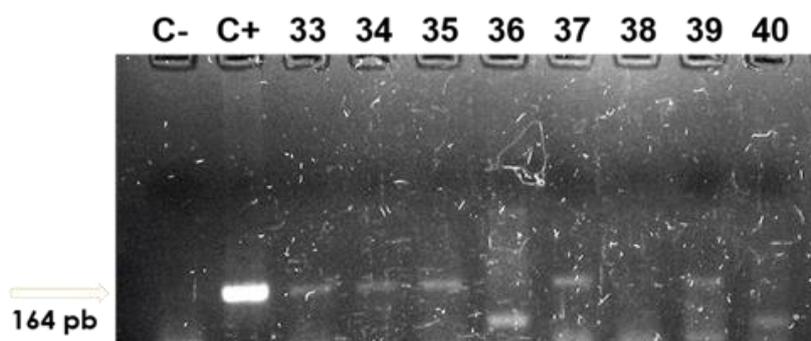


Tabela 6 - Detecção e Genotipagem de BPV em sangue e lesão de vaca matriz (três fêmeas), e de sangue e lesão de fetos bovinos.

Amostras	Tecido	<u>Identificação</u>	Idade	Genotipagem
				BPV
Matriz bovina	Sangue			2, 9, 10, 12, 14
	Lesão	36*		2, 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 14
	Placenta			2, 3, 9, 11 e 12
Feto	Pele			2, 3, 12
Matriz bovina	Sangue		5 anos	2, 9, 10, 12, 14
	Lesão	51		2, 4, 8, 9, 10, 11, 12
	Placenta			-
Feto bovino	Sangue			2, 9, 10, 12, 14

	Pele		2, 9
	Sangue	3 anos	2, 9, 12, 14
Matriz bovina	Lesão	76	2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 14
	Placenta		8,12
Feto bovino	Sangue		2,9, 10,12, 14
	Pele		2

***Não houve coleta da amostra de sangue do feto.**

3.2.3 Análise do RNA, cDNA e expressão de E5BPV-2

Para análise da qualidade do cDNA, tivemos a amplificação por um *primer* de gene endógeno *mbl2* (Figura 10). Foi possível obter uma boa avaliação da qualidade do RNA extraído e cDNA construído.

Obtivemos uma avaliação da expressão gênica, onde identificamos atividade viral em 11/12 amostras avaliadas quando a expressão de E5BPV-2, apenas uma amostra de cDNA não demonstrou está expressa (Figura 11).

Figura 10 - Gel representativo da PCR de *Mbl2* bovina nas amostras de cDNA extraídas. C- Controle negativo; C + Controle positivo: PLACENTA-OVÁRIO amostras de DNA de placenta, lesões, feto, bexiga, útero e ovário.

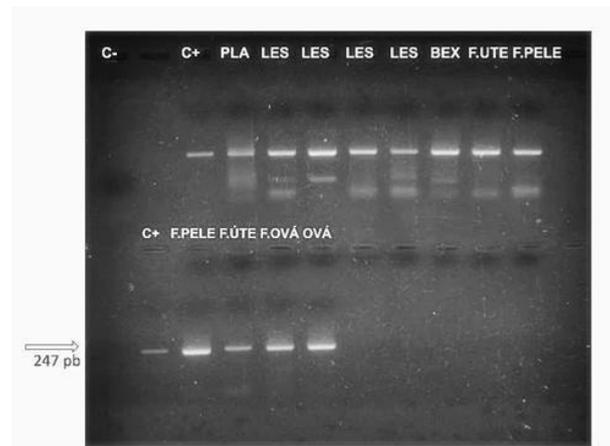
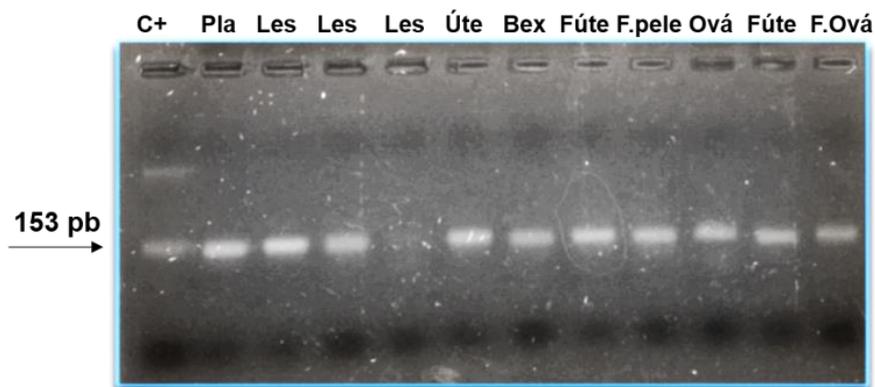


Figura 11 - Gel representativo da PCR com amostras de cDNA analisadas e primers E5BPV-2. C + controle positivo, amostras de cDNA sintetizadas PLA-OVÁ, amostras de DNA de placenta, lesão, útero, bexiga, ovário, feto (pele, útero e ovário). Fragmento de 153 pb.



3.2.4 Resultados do Sequenciamento

As seqüências geradas confirmaram a identidade das amostras entre 98-99% com seqüências já depositadas no *Genbank* e blast, podendo estas amostras serem consideradas variantes virais dos BPVs investigados. Confirmando também que as amostras não são artefatos de reações de PCRs e muito menos resultados falso-positivos.

3 3 Discussão

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 & Roperto, 2008). Em alguns casos provocados por tipos virais específicos podem vir a se tornar lesões malignas (De Villiers *et al.*, 2004). Essa formação de lesões malignas está associada a diversos cofatores ambientais (Campo, 2006).

Os tipos de BPV encontrados nas lesões foram: BPV-2, -3, -4, -6, -8, -9, -10, -11, -12, -14, resultados próximos aos obtidos por Carvalho *et al.* (2012). Os BPVs - 5 e -13 não foram detectados.

Geralmente os papilomavírus são descritos como epiteliotrópicos, no entanto, o DNA do BPV foi detectado em diferentes sítios como o sêmen (Silva *et al.*, 2011, 2013) sangue periférico, leite, plasma e colostro (Stocco dos Santos *et al.*, 1998). O tecido sanguíneo foi identificado como propício à 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.*, 2014) tornando o sangue como veículo disseminador do vírus por todo o corpo do animal, podendo facilitar a infecção pelo BPV.

O BPV-4 apresentou uma quantidade irrisória de amostras positivas, no sangue, resultados semelhantes com o encontrado na literatura (Santos *et al.*, 2014). Já nas amostras de lesões, o BPV-4 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 BPV-3 e BPV-6 apresentaram uma baixa detecção em relação aos tipos mais encontrados nas amostras de sangue, resultados divergentes dos detectados por Santos *et al.* (2014); que em suas análises em tecido sanguíneo, identificaram mais de 50% das amostras com os BPV-3 e BPV-6. A discrepância entre os resultados pode ser explicada pela diferença nas populações estudadas.

Nas amostras de sangue analisadas em nosso estudo, não foram encontrados os tipos de BPV-5 e -8. Estes resultados diferem em parte da literatura onde os papilomas bovinos têm sido diagnosticados em todo o mundo. Santos *et al.*, (2014) em suas análises verificaram a presença de BPV-8 em amostras de sangue em bovinos de fazendas do interior da Bahia, Brasil, e a ausência de BPV-5 em suas amostras.

Na literatura podemos observar que o tipo viral mais comum em lesões cutâneas ocorre com os tipos virais BPV-1 e BPV-2 (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.

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 BPV-12 foi o mais encontrado nas amostras analisadas. O BPV-14 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 com nossas amostras positivas para o BPV-14.

O BPV-11 apresentou uma alta incidência nas amostras oriundas de lesões cutâneas, já nas amostras de sangue não foram detectadas em grande quantidade. O BPV- 5 e -13 não foram detectados em nenhuma das amostras.

A coinfeção nas amostras de sangue foi observada em 99% das amostras analisadas, com dois ou mais tipos de BPV. A múltipla infecção 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.

Para o BPV-14 enfatizamos a sua detecção em lesões cutâneas e sangue. A detecção do BPV-14 na literatura foi relatada anteriormente em sarcoides felinos (Munday et al. 2015) e em tumores de bexiga urinária (Bocaneti et al., 2014). O BPV-13 foi descrito pela primeira vez no Brasil (Lunardi et al., 2013), porém não foi detectada a presença do BPV-13 em nossas amostras, provavelmente porque este tipo viral não estava em circulação no rebanho estudado.

Em nosso estudo foram encontrados vários tipos de BPVs nas amostras de sangue, com uma infecção múltipla de até nove tipos diferentes no mesmo animal. Santos *et al.*, (2014) 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) às coinfeções podem ser uma consequência da imunossupressão, fatores ambientais e de estresse, facilitando a existência de infecções persistentes em rebanhos bovinos.

A presença do BPV-2 já foi descrita em espermatozoides e líquido seminal (Silva et al., 2011) e a expressão de BPV-2 já foi demonstrada em sangue e sêmen de cavalos (Silva et al., 2014). Freitas et al. (2003) demonstraram a presença de BPV-1 em amostra da placenta, líquido seminal da fêmea bovina, também no sangue da amostra do recém-nascido.

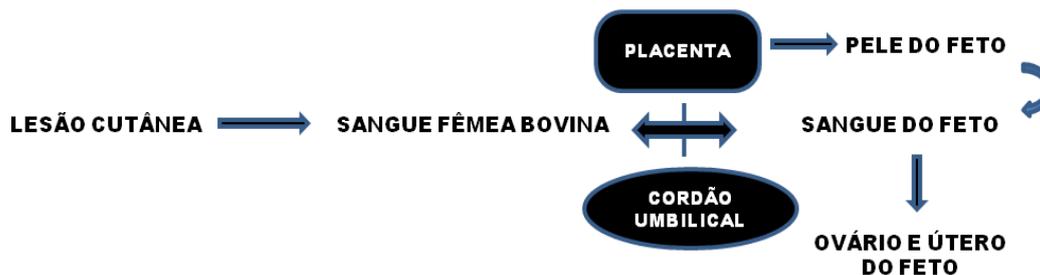
Roperto et al., 2019 correlacionaram a evidência de transmissão materno-fetal do vírus por meio de amostra de fetos (rim e fígado) e câncer de bexiga urinária, analisando a presença de BPV-2. Roperto et al., 2012 analisaram a presença de BPV-2 e a expressão da proteína E5 em placentas de vacas, e epitélio coriônico e uterino. No nosso trabalho também podemos corroborar com esta evidência, pois obtivemos também resultados positivos em amostras fetais, tecidos reprodutivos e placenta. Além disso, conseguimos identificar a presença de outros tipos virais além do BPV-2.

Podemos identificar além da presença viral, a presença de atividade viral através da análise de expressão gênica de E5 do BPV-2 em algumas amostras

representativas dos tecidos abordados. Verificando a importância do vírus, de sua ação viral e disseminação no rebanho. Uma presença de 100% para alguns tipos virais verifica a importância de rever métodos de manejo e criação dos animais, na tentativa de minimizar os danos causados aos animais e a bovinocultura.

No nosso estudo podemos verificar também a via transplacentária. A partir da identificação da presença de BPV tanto no sangue da fêmea bovina como no sangue fetal, e na placenta da matriz bovina. Existe em especial uma relação das amostras positivas da placenta e das lesões cutâneas. Podemos ilustrar essa via de transmissão transplacentária (fêmea bovina para o feto), através da placenta bovina e cordão umbilical (Figura 12).

Figura 12 - Via de transmissão transplacentária.



4 CONCLUSÃO

Concluimos que a via de transmissão transplacentária é uma característica do BPV. Podemos corroborar que a coinfeção existe e se confirma nos nossos dados, com a múltipla infecção de até 10 tipos numa mesma amostra. O BPV-14 demonstrou ser bem comum no rebanho estudado (dados inéditos).

REFERÊNCIAS

Associação Brasileira de Criadores de Girolando (2017). <http://www.girolando.com.br/index.php?paginasSite/girolando,3,pt>, Acesso em 05/09/2020 às 13:00.

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.

Bauermann FV, Joshi LR, Mohr KA, Gerald F, Cultish GF, Meier P, Chase C, Christopher-Henning's J, Diego G, Dial DG (2017) A novel bovine papillomavirus type in the genus *Dyokappapapillomavirus*. *Archives of Virology* 162(10):3225–3228.

Becenti F, Altamura G, Corteggio A, Velescu E, Roperto F and Borzachiello G (2014) Bovine papillomavirus: New insights into an old disease. *Transbound Emerg Dis.* 63(1):14-23.

Bogaert L, Van Poucke M, De Baere C, Dewulf J, Peelman L, Ducatelle R, Gasthuys F, Martens A (2007) Bovine papillomavirus load and mRNA expression, cell proliferation and p53 expression in four clinical types of equine sarcoid. *J Gen Virol* 88:2155–2161.

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.

Davis LG, Dibner MD, Battey JF (1986) *Basic Method in Molecular Biology*. 1^a ed. Londres:Elsevier, 388p.

Estatística da Produção Pecuária (2018) Indicadores IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 52p.

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.

Hamad MA, Al-Shammari AM, Odisho SM, Yaseen NY (2016) Molecular and phylogenetic analysis of bovine papillomavirus type 1: first report in Iraqi cattle. *Adv Virol* 2016:1–7.

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.

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, de Alcantara BK, Rodrigues WB, de Miranda AB, Alfieri AF (2013) Genomic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Veterinary Microbiology* 162(1):207-213.

Melo CB and Leite RC (2003) Papilomatose bovina. *Ciência Veterinária nos Trópicos* 6(1):1-12.

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

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.

Munday JS, Thomson N, Dunowska M, Knight CG, Laurie RE, Hills S (2015) Genomic characterization of the feline sarcoid-associated papillomavirus and

proposed classification as *Bos taurus papillomavirus* type 14. *Veterinary Microbiology* 177:289-295.

Munday JS (2014) Bovine and human papillomaviruses: a comparative review. *Vet Pathol* 51(6):1063–1075

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

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. *Journal of General Virology* 85:2191-2197.

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 tumors: possible biological role. *Journal of General Virology* 89:3027–3033.

Roperto S, Comazzi S, Pauline 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. *Journal of General Virology* 92:1787–1794.

Roperto S, Borzacchiello G, Esposito I, Riccardi M, Urraro C, Lucà R, et al. (2012). Productive Infection of Bovine Papillomavirus Type 2 in the Placenta of Pregnant Cows Affected with Urinary Bladder Tumors. *PLoS ONE* 7(3): e33569.

Roperto S, Russo V, Corrado F, Munday JS, De Falco F, Roperto F (2018) Detection of bovine Deltapapillomavirus DNA in peripheral blood of healthy sheep (*Ovis aries*). *Transbound. Emerg. Dis.* 65:758–764, doi:10.1111/tbed.12800.

Roperto S, Russo V, De Falco F, Taulescu M, Roperto F (2019) Congenital papillomavirus infection in cattle: Evidence for transplacental transmission. *Veterinary Microbiology* 230:95-100.

Santos EUD, Silva MAR, Pontes NE, Coutinho LCA, Paiva SSL, Castro RS, Freitas AC (2014) Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases* 63(1): 103-108.

Savini F, Gallina L, Mazza F, Mariella J, Castagnett C, Scagliarini A (2019) Molecular Detection of Bovine Papillomavirus DNA in the Placenta and Blood of Healthy Mares and Respective Foals. *Veterinary Sciences* 6:(14): doi:10.3390/vetsci6010014.

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, Roperto F, Becenti F, Velescu E, Freitas AC, Carvalho CCR, Cavalcanti KPS and Borzachiello G (2013) Expression of connexin 26 and bovine papillomavirus E5 in cutaneous fibropapillomas of cattle. *Veterinary Journal* 195:337–343.

Silva, MAR, Silva KMG, Jesus ALS, Barros LO, Corteggio A, Altamura G, Borzacchiello G, Freitas AC (2014) The Presence and Gene Expression of Bovine

Papillomavirus in the Peripheral Blood and Semen of Healthy Horses. *Transboundary and Emerging Diseases* 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.

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.

Tozato et al. (2013) Teat papillomatosis associated with bovine papillomavirus types 6, 7, 9, and 10 in dairy cattle from Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 44(3):905-909.

Ugochukwu ICI, Aneke CI, Idoko SI, Sani, NA, Amoche, AJ, Mshiela WP, Ede RE, Ibrahim NDG, Njoku CIO, Sackey AKB (2018) Bovine papilloma: aetiology, pathology, immunology, disease status, diagnosis, control, prevention and treatment: a review. *Comparative Clinical Pathology*. DOI 10.1007/s00580-018-2785-3

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.

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 (2009) Simultaneous presence of bovine papillomavirus (BPV) and bovine leukemia virus (BLV) in different bovine tissues: in situ hybridization and cytogenetic analysis. *Genetics Molecular Research* 7:487-497.

Zheng ZM, Baker CC (2006) Papillomavirus genome structure, expression and posttranscriptional regulation. *Front Biosci* 11:2286-2302.

Zur Hausen H (2002) Papillomaviruses and Cancer: From Basic Studies to Clinical Application. *Nature Reviews Cancer* 2: 342-350.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Artigo submetido à revista Archives of virology

PRESENCE OF BPV-2 IN GOAT (*Capra hircus*) SPECIMENS

Pontes, NE^a ; Tibúrcio Jr, E^a; Freitas AC^a; Andrade, MAS^a; Carrazzoni, P.C.^a; Silva, MAR^b

^a Federal University of Pernambuco, Prof Moraes Rego Avenue, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP 50670-901, Brazil. Telephone: +55 81 2126 8000

^b Federal Institute of Education, Science and Technology of Paraíba, May 1^o Avenue, 720, Jaguaribe, João Pessoa, PB, CEP 58015-430. Telephone: +55 83 3612 1200

Corresponding authors: AC Freitas, e-mail: acf_ufpe@yahoo.com.br; Fax: +55 081 2126 8522; MAR Silva, e-mail: angel-jp@hotmail.com; Fax +55 081 2126 8522.

ABSTRACT

Bovine Papillomaviruses (BPVs) are constituted by double strand DNA with approximately 8000 bp in length. There are 24 types of BPV (BPV-1 to 24) which infect either bovine skin and fluids, such as blood, semen, milk and colostrum. BPVs are also capable of infecting other species such as buffalo, giraffe, tapirs, horses and zebras but, so far, there is no report about the detection of BPV in goat specimens. For this reason, our study aimed to investigate the presence of BPV-2 in goat specimens (skin lesions and milk) in order to assess the possible existence of cross infection in a new non-bovine species. For that, specimens from goat (two from skin lesions and one from milk belonged to two individuals) were obtained. The presence of BPV-2 DNA was verified by PCR through specific primers. BPV-2 DNA was detected in one skin lesion and milk specimen from the same animal. Therefore, it is possible to conclude that BPV-2 may infect goat, a new host animal and, as in bovine, this virus is able to be found in epithelial tissue and body fluids.

Keywords: BPV-2, goat, PCR ,detection

1. INTRODUCTION

Bovine Papillomaviruses are constituted by double strand DNA with approximately 8000 bp in length [1], [2], [3], [4]. They belong to *Papillomaviridae* family and 24 BPV types (BPV-1 to 24) have been reported so far (<https://pave.niaid.nih.gov/>). However, new types and subtypes may exist [5], [1], [6], [3], [4], [7], [8].

In addition to bovine, BPV can infect other animal species such as buffalos and giraffes, causing the appearance of fibropapillomas and bladder lesions, as well as anta, horses, African antelope and zebras, causing papillomas and sarcoides [9], [10], [6], [11], [12], [13]. According to Bocaneti [2], four types of BPV have been described (BPV-1, 2, 5 and 13) as infectious agents of non-bovine species.

Despite BPV has been classically described to have tropism for epithelial tissues, the activity of this virus has been detected in other sites like blood and semen [14], [15], [11]. A high incidence of BPV has been detected in commercially frozen semen [7] and its biologic activity has been noticed in semen and blood [16], [11]. Furthermore, this virus has been found in several fluids specimens such as serum, milk and colostrum [17], [18], and in various components of the reproductive tract, such as oocytes, ovary, uterus, cumulus cells, uterine fluid, placenta and amniotic fluid [18].

Capra hircus presents a specific papillomavirus ChPV-1 [19], and ChPV-2 [20] which has approximately 7600 bp and is phylogenetically close to BPV-5. It contains sequences of ORFs from E1, E2, L1 and L2 genes, like the ORFs from 54 types of HPV and BPV. In addition, these sequences form clusters with BPVs-3, -4, -6 and HPVs-5 and -8 [19], [21].

By now, no study has ever been reported about the detection of BPV in goat clinical specimens. Therefore, this study aimed at investigating the presence of BPV-2 in skin lesions and milk specimens from goat to assess the existence of cross infection between this virus and non-bovine species.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Clinical specimens

Two biopsies from skin lesions (Fig 1) and one of milk were collected from goats from the Experimental Station in Pernambuco Agronomic Institute, in Sertânia city, situated in Pernambuco state, Brazil.

2.2. Negative and positive controls

For positive and negative controls, it was obtained positive and negative DNA samples for BPV-2 from skin lesions of female bovine. The study was carried out in the Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy (LEMTE-UFPE).

2.3. DNA extraction

Total DNA was extracted using a commercial kit (Wizard® Genomic DNA Purification; Promega, Wisconsin, EUA) and stored at -20°C until analysis. Extracted DNA was quantified using NanoVue (GE, Germany).

2.4. PCR assays

DNA (≈ 100 ng) and Master mix reagent (Promega, USA) were used for execution of PCR assay. For BPV-2 detection, DNA specimens were submitted to specific primers for BPV-2 (Silva [7]). Amplification products (10 μ L) were submitted to agarose gel electrophoresis in TAE 2%, stained with ethidium bromide, visualized under UV light and archived electronically.

2.5. Sequencing and bioinformatics analysis

The amplicons were sequenced using the kit ABI PRISM BigDye® Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers for sequencing were the primers BPV2F and BPV2R. The sequences obtained were analysed by the programs BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) and BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3. RESULTS:

BPV-2 was found in lesion and milk samples provided from the same animal; for another animal, the lesion was negative (Fig 2). The controls were provided from bovine specimens: one was positive for BPV-2 while another was negative, showing that there weren't false positive or negative in the PCR assay.

The null control (without DNA) was negative as expected; thus, there was no cross-contamination. Samples positive for BPV-2 were confirmed by sequencing.

4. DISCUSSION

It was demonstrated the presence of BPV-2 amplification product (164 bp) by specific PCR assay using DNA samples extracted from skin lesion and milk specimens of goat. A sample for another animal was BPV-2 negative. Control specimens were used and showed coherent results. Our data confirmed the results found in other studies which detected BPV-2 in non-bovine species.

Although Papillomavirus are known as strictly species-specific, several studies have demonstrated the presence of BPV in different mammal species [6], [22], [23], [11], [24]. Specifically, BPV-2 is one of the most described viral type found in different host types.

In addition to being detected in papillomas of mammals of *Bovidade* family, such as sheep, buffalo, bison and antelope [12], [13], BPV has also been described in more distantly related animals when caused papillomas and sarcoids. In this way, the presence of BPV-2 in goat, which also belong to *Bovidade* family, is a very plausible finding.

Several studies have reported the presence and the expression of BPV genes in non-epithelial tissues of bovine animals [2], [25], [14]. In this way, blood was pointed out as dissemination way BPV can reach other tissues in the host [6], [23], [15]. Even in other hosts, such as horses and zebras, BPV has been found in non-epithelial sites as blood and semen [11], [12]. Therefore, it is possible that in the goat, as well as observed for cattle and equines, the blood may have acted as a vehicle of dissemination of BPV to other sites, such as the breast tissue.

Considering the observed aspects, it is concluded that BPV-2 DNA was detected in another host animal (*Capra hircus*). To the best of our knowledge, it was the first time the presence of this virus was detected in *Capra hircus* specimens, both in epithelial and non-epithelial tissues of this host. However, new studies are necessary and important to understand the biology and epidemiology of this viral type.

Acknowledgements

The authors thank the FACEPE for the financial support and the Agronomy Institute of Pernambuco for providing the samples. We thank Annelies Mariah Bronti for the English editing and review.

5. REFERENCES

- [1] Bauermann FV, Joshi LR, Mohr KA, Gerald F, Kutish GF, Meier P, Chase C, Christopher-Hennings J, Diego G, Diel DG. (2017). A novel bovine papillomavirus type in the genus *Dyokappapapillomavirus*. *Archives of Virology* 162(10):3225–3228. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3443-9>
- [2] Bocaneti F, Altamura G, Corteggio A, Velescu E, Roperto F, Borzacchiello G. (2016). Bovine Papillomavirus: New Insights into an Old Disease. *Transboundary and Emerging Diseases* 63(1):14-23. <https://doi.org/10.1111/tbed.12222>
- [3] Lunardi M, Alfieri A A, Otonel R A, de Alcantara B K, Rodrigues W B, de Miranda A B, Alfieri A F. (2013). Genomic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Veterinary Microbiology* 162(1):207-213. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.030>
- [4] Munday J S, Thomson N, Dunowska M, Knight C G, Laurie, R E, Hills S. (2015). Genomic characterisation of the feline sarcoid-associated papillomavirus and proposed classification as *Bos taurus* papillomavirus type 14. *Veterinary Microbiology* 177: 289-295. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.019>
- [5] Batista M V A, Silva M A R, Pontes N E, Reis M C, Corteggio A, Castro R S, Borzacchiello G, Balbino V Q, Freitas A C. (2013). Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. *The Veterinary Journal* 197:368-373. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.01.019>
- [6] Freitas A C, Silva M A R, Jesus A L S, Mariz F C, Cordeiro M N, Albuquerque B M F, Batista M V A. (2011). Recent insights into Bovine papillomavirus. *African Journal of Microbiology Research* 55:6004-6012. <https://doi.org/10.5897/AJMRX11.020>
- [7] Silva M A R, Carvalho C C R, Coutinho L C A, Reis M C, de Aragão Batista M V, de Castro R S, dos Anjos F B R, de Freitas A C. (2012). Co-infection of Bovine Papillomavirus and Feline-Associated Papillomavirus in bovine cutaneous warts. *Transboundary and Emerging Diseases* 59:539-543. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01307.x>
- [8] Silva M A R, Pontes N E, Da Silva K M G, Guerra M M P, Freitas A C. (2011). Detection of bovine papillomavirus type 2 DNA in commercial frozen semen of bulls (*Bos taurus*). *Animal Reproduction Science* 129: 146-151. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.11.005>

- [9] Bogaert L, Martens A, Kast W M, Van-Marck E, De Cock H. (2010). Bovine papillomavirus DNA can be detected in keratinocytes from equine sarcoids. *Veterinary Microbiology*, 146, 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.032>
- [10] Bogaert L, Van-Heerden M, De Cock H E V, Martens A, Chiers K. (2011). Molecular and immunohistochemical distinction of equine sarcoid from schwannoma. *Veterinary Microbiology* 10:1177. <https://doi.org/10.1177/0300985810377070>
- [11] Silva M A R, Silva K M G, Jesus A L S, Barros L O, Corteggio A, Altamura G, Borzacchiello G, Freitas A C. (2014). The Presence and Gene Expression of Bovine Papillomavirus in the Peripheral Blood and Semen of Healthy Horses. *Transboundary and Emerging Diseases* 61(4):329–333. <https://doi.org/10.1111/tbed.12036>
- [12] Van Dyk E, Oosthuizen M C, Bosman A-M, Nel P J, Zimmerman D, Venter E H. (2009). Detection of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected and healthy free-roaming zebra (*Equus zebra*) populations in South Africa. *Journal of Virological Methods* 158:141-151. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.02.008>
- [13] Van Dyk E, Bosman A M, Van Wilpe E, Williams J H, Bengis R G, Van Heerden J, Venter E H. (2011). Detection and characterisation of papillomavirus in skin lesions of giraffe and sable antelope in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* 82(2):80–85. URI: <http://hdl.handle.net/2263/17147>
- [14] Lindsey C J, Almeida M E, Vicari C F, Carvalho C, Yagui A, Freitas A C, Beçak W, Stocco R C. (2009). Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genetics and Molecular Research* 8(1): 310-318.
- [15] Roperto S, Paolini F, Urraro C, Russo V, Borzacchiello G, Raso C, Rizzo C, Roperto F, Venuti A. (2008). Detection of bovine papillomavirus type 2 in peripheral blood of cattle urinary bladder tumours: possible biological role. *Journal of General Virology* 89:3027-3033. doi: 10.1099/vir.0.2008/004457-0
- [16] Roperto S, Comazzi S, Paolini F, Borzacchiello G, Esposito I, Russo V, Urraro C, Venuti A, Roperto F. (2011). Peripheral blood mononuclear cells are additional sites of productive infection of bovine papillomavirus type 2. *Journal of General Virology* 92: 1787-1794. doi: 10.1099/vir.0.031740-0

- [17] Freitas A C, Carvalho C, Brunner O, Birgel Jr E H, Libera A M D, Benesi F J, Beçak W, Stocco dos Santos R C. (2003). Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the vírus: a discussion about BPV-1. *Brazilian Journal of Microbiology* 34:76-78. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822003000500026>
- [18] Freitas A C, Silva M A R, Carvalho C C R, Birgel-Jr E H, Santos J F, Beçak W, Stocco dos Santos R C. (2007). Papillomavirus DNA detection in non-epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus. In: *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, pp. 697-704, Edited by A. Mendez-Villas, Formatex: Badajoz.
- [19] Doorslaer K V, Rector A, Vos P, Ranst M V. (2006). Genetic characterization of the *Capra hircus* papillomavirus: A novel close-to-root artiodactyl papillomavirus. *Virus Research* 118:164–169. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.12.007>
- [20] Dogan F, Dorttas SD, Dagalp SB, Ataseven V, Alkan F. (2018). A teat papillomatosis case in a Damascus goat (Shami goat) in Hatay province, Turkey: a new putative papillomavirus? *Archives of Virology* 163:1635–1642. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3781-2>
- [21] Kulski J K, Ward B K. (2000). Cloning and characterization of a novel caprine genomic repetitive element that hybridizes with papillomavirus DNA. *Electrophoresis* 21(5):896-903. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000301\)21:5<896::AID-ELPS896>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000301)21:5<896::AID-ELPS896>3.0.CO;2-1)
- [22] 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. *Transboundary and Emerging Diseases* 57:185–196. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2009.01096.x>
- [23] Roperto S, Russo V, Corrado F, Munday J S, De Falco F, Roperto F. (2018). Detection of bovine Deltapapillomavirus DNA in peripheral blood of healthy sheep (*Ovis aries*). *Transboundary and Emerging Diseases* 1–7. <https://doi.org/10.1111/tbed.12800>
- [24] Yuan Z, Philbey A W, Gault E A, Campo M S, Nasir L. (2007). Detection of bovine papillomavirus type 1 genomes and viral gene expression in equine inflammatory skin conditions. *Virus Research* 124:245–249. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.10.012>

[25] Carvalho R F, Stocco R C. (2009). Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil. *Genetics and Molecular Research* 8:1474-1480. <https://doi.org/10.4238/vol8-4gmr668>

Figure 1



Figure 2

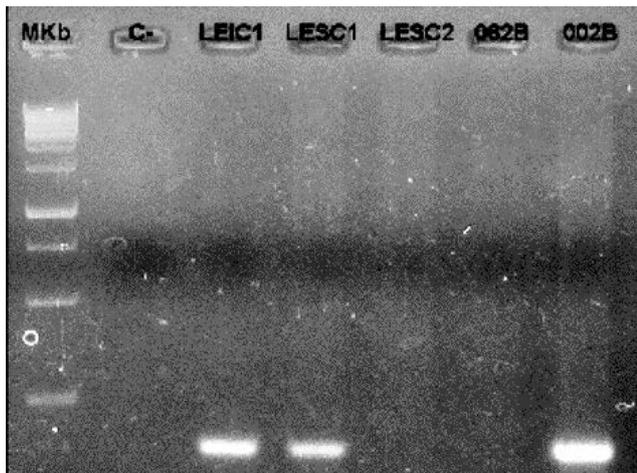


Figure 1: Photo from epithelial cutaneous papilloma of goat from a city of Pernambuco state.

Figure 2: Detection of BPV-2 in goat and female bovine samples. Amplification products of PCR assay using specific primers for BPV-2 showing the expected fragment of 164 pb in agarose gel following DNA electrophoresis. Legend: M1kb: 1 kb DNA ladder; C- : assay negative control (without template); LEIC1: goat milk sample 1; LES1: goat skin lesion sample 1; LES2: goat skin lesion sample 2; 062B: BPV-2-negative skin lesion sample from bovine; 002B: BPV-2-positive skin lesion sample from bovine.

APÊNDICE B Normas da Revista Archives of Virology

Brief Reports

Papers describing sequences only will only be considered for publication as “Original Articles” or “Brief Reports” if the genomic organization derived from the nucleotide sequences determined differs fundamentally from those of typical members of the virus genus/family. Preferably, the biological significance and function of certain sequence differences should also have been experimentally addressed.

If a manuscript only describes the **complete** sequence of a virus for which no or only very limited sequence information is available, the manuscript can be considered for submission in the format of an Annotated Sequence Record (see link ‘Annotated Sequence Records’). To facilitate a thorough review of any sequence-based manuscript, sequences generated by the author(s) and described in the manuscript **must** be either available from GenBank or some other public database, or provided as FASTA (or similar) files together with the submitted manuscript.

Brief Reports are intended for the presentation of observations that do not warrant a full-length article—they are not meant for preliminary communication of incomplete studies.

- They should not exceed six pages (21000 characters incl. spaces) when printed. This should include all the text, i. e. short Abstract (no more than 100 words), Acknowledgements, References and legends. Division of the text by headings of sections should be omitted, but the general sequence of introduction, materials and methods, results, and discussion may be generally maintained. References should be cited in the same way as in full-length articles. In addition to the text, a maximum of 3 figures or 3 Tables (any combination of 3 such items) can be included.

Review

Reviews are intended to draw together important information from recent publications on subjects of broad interest. They are meant to provide a venue for critical examination and considered opinion of such information.

- Reviews are not meant to be encyclopedic, and should not exceed 20 pages when printed. Reviews may contain figures and tables. References should be cited in the same way as in full-length articles. It is recommended that authors contact a member of the Editorial Board beforehand to determine if a proposed review is likely to be suitable for publication.

Annotated Sequence Records

- Annotated Sequence Record papers are intended to draw attention to the availability of **c•o•m•p•l•e•t•e** viral sequences that are appreciably different from those of known sequenced isolates. Currently, we welcome the molecular description of isolate(s) in the format of an Annotated Sequence Record only if (i) the complete genome sequence of a new or established member of a virus genus is reported for the first time and (ii) the isolate of a virus species under study has unusual molecular features (in terms of differences in sequence identity, genome organization or recombination) and/or differs strikingly from other isolates of the virus in biological properties. Sequences that do not differ from already deposited or published type (reference) sequences by more than random mutations will not be accepted for publication.
- These papers should not exceed two pages in length, when printed (which equals four manuscript pages with 1800 characters each [incl. spaces], including references and figure legends, but excluding the title page and tables) and should not have more than 2 figures or tables.
- The report should give information on the provenance of the virus material (isolated by whom, when and where; together with a reference if available), a reference to the sequence (accession number), an annotated diagram of the

sequence information (ORFs, promoters, control sequences etc.), some biological information (host range, pathogenicity, etc.) and the justification for considering why the material is different from previously published isolates.

- To facilitate a thorough review of any sequence-based manuscript, sequences generated by the author(s) and described in the manuscript must be either available from GenBank or some other public database, or provided as FASTA (or similar) files together with the submitted manuscript.

Special Issues

- Special issues of Archives of Virology are published to record the proceedings of meetings, symposia, conferences, and congresses on various virologic topics, special issues are also published to record multi-authored treatises and reviews of large, complex virologic topics. In general, special issues are of similar size and page format as the regular issues of Archives of Virology; the number of pages per issue is limited to 240 pages. The Archives of Virology provides full and flexible publishing and marketing services, in timely fashion. Individuals who are organizing a meeting, symposium, conference, or congress, and individuals who would like to organize the writing and publication of a treatise or large review are invited to communicate directly with the Special Issues Editor for further information.

Virology Division News:

Papers published under the rubric Virology Division News (VDN) should describe news and developments that are of interest to the Virology Community, including papers on virus taxonomy, classification, and nomenclature, as well as minutes of IUMS or ICTV committees and obituaries of prominent virologists.

If the authors suggest or discuss novel taxa, the authors should include the following Disclaimer to the article:

- The taxonomic changes suggested/proposed/described here

- (i) have not been endorsed by the ICTV Executive Committee,
- (ii) may differ from any new taxonomy that is ultimately approved by the ICTV, and
- (iii) is presented for discussion only but has no official standing.

Further and if applicable, the authors should add the following sentence: "this article is related to an ongoing taxonomic proposal, submitted to the ICTV but not yet accepted at the time of submission."

APÊNDICE C - Curriculum vitae (Lattes)

Nayara Evaristo de Pontes

Curriculum Vitae

Março/2019

Nayara Evaristo de Pontes

Curriculum Vitae

Nome civil

Nome Nayara Evaristo de Pontes

Dados pessoais

Filiação Ronaldo Evaristo de Pontes e Iranete Maria da Silva Pontes

Nascimento Recife/PE - Brasil

Endereço residencial

Endereço eletrônico

E-mail para contato : nayar-apontes@hotmail.com

E-mail alternativo nayara.evaristopontes@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2015 Doutorado em Genética.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: Avaliação da Carga viral e Expressão Gênica em animais infectados por Papilomavírus bovino tipos 2 e 13 no Desenvolvimento da Hematúria Enzoótica e da Papilomatose bovina

Orientador: Antônio Carlos de Freitas

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

- 2012 - 2014** Mestrado em Genética.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: Estudos Moleculares Aplicados ao circovírus suíno tipo 2: Desenvolvimento da técnica de Nested-PCR em tubo único (STNPCR) e descrição das variantes virais em Pernambuco, Ano de obtenção: 2014
 Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas
 Co-orientador: Dra. Clara Nilce Barbosa
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2007 - 2011** Graduação em Licenciatura plena em ciências biológicas.
 Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2013 - 2015** Ensino Profissional de nível técnico em Técnico em Análises Químicas.
 Centro universitário Maurício de Nassau - Recife, UNINASSAU, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Prefeitura Municipal de Jaboatão dos Guararapes - P JABOATÃO

Vínculo institucional

2014 - 2015 Vínculo: CONTRATADO , Enquadramento funcional: PROFESSOR DE CIÊNCIAS , Carga horária: 20, Regime:

Parcial

2. Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Vínculo institucional

2014 - 2014

Projetos

Projetos de pesquisa

2015 - Atual Avaliação da Carga Viral e Expressão Gênica em animais infectados por Papilomavírus bovino tipos 2 e 13 no desenvolvimento da Hematúria Enzoótica e da Papilomatose bovina

Descrição: Atualmente o Brasil possui a maior população bovina comercial do mundo, entretanto alguns fatores, dentre os quais as doenças infectocontagiosas, ameaçam a produtividade desse rebanho. Entre estas doenças se encontra a papilomatose, causada pelo Papilomavirus bovino (BPV), provocando lesões de pele que podem evoluir para o câncer devido à ação sinérgica de genética e cofatores ambientais, e em associação com a planta *Pteridium aquilinum* (samambaia) está diretamente relacionada ao desenvolvimento da Hematúria Enzoótica Crônica (HEC). Atualmente, existem 13 tipos de BPV (BPV-1 a 13) descritos na literatura, além de diversos prováveis novos tipos e subtipos. Além disso, não estão bem elucidados tecidos afetados, carga e expressão destes vírus na população bovina afetada sem o consumo de samambaia, sendo necessários estudos que demonstrem a biologia da infecção do BPV-2 e BPV-13 nesses casos. Alguns autores sugerem que o sangue possa atuar como sítio de reserva e

propagação para o BPV. Desta forma, visto a importância da HEC e dos prejuízos econômicos causados por ela, faz-se necessário, maiores esclarecimentos a respeito da doença, como forma de auxiliar o entendimento do papel do BPV na ausência da samambaia, contribuindo para a adoção de possíveis medidas profiláticas e terapêuticas que possam vir a ser tomadas, bem como para a pecuária nacional. Portanto, o objetivo desse trabalho será de avaliar animais positivos para BPV-2 e BPV-13 em dieta livre de samambaia quanto ao desenvolvimento de lesões de bexigas e Hematúria Enzoótica Crônica (HEC). Serão utilizadas amostras de sangue coletadas através de punção venosa da jugular de bovinos para realização de hemograma, bioquímica clínica, genotipagem e carga viral. Amostras de pele serão coletadas através de biópsia para realização de genotipagem, análise de carga e expressão viral, e amostras de urina, através de micção espontânea para urinálise e genotipagem. Imagens ultrassonográficas do trato urinário, através de aparelho Pie Medical, serão realizadas para identificação e acompanhamento de lesões tumorais. As extrações de DNA, RNA e síntese de cDNA será realizada simultaneamente para DNA e RNA com kit comercial seguindo as condições indicadas pelo fabricante. A detecção de BPV-2 e BPV-13 em lesões cutâneas, sangue e urina, serão submetidas à tipificação com primers específicos para os tipos virais BPV-2 e BPV-13. A Análise de Carga viral nas lesões cutâneas e amostras de sangue serão avaliadas com primers desenhados para anelar na região L1 de BPV-2 e BPV-13. Para os Ensaio de RT-PCR para verificação da expressão gênica de BPV, serão desenhados primers para genes do BPV e utilizados nas amostras de cDNA produzidas anteriormente.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Doutorado (1);

Integrantes: Nayara Evaristo de Pontes; Antonio Carlos de Freitas (Responsável); Maria Angélica Ramos da Silva

Projeto de extensão

2014 - 2014 **ORIENTAÇÃO TÉCNICA AS CRIAÇÕES DE SUÍNOS DESTINADAS À
SUBSISTÊNCIA NA REGIÃO METROPOLITANA DE RECIFE-PE**

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Nayara Evaristo de Pontes; Clara Nilce Barbosa (Responsável)

.

Áreas de atuação

1. Genética

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Razoavelmente

Espanhol Compreende Pouco, Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Pouco

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SANTOS, E. U. D.; SILVA, M. A. R.; PONTES, N. E.; COUTINHO, L. C. A.; PAIVA, S. S. L.; CASTRO, R. S.; FREITAS, A. C.

Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of

Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases.*, v.63, p.n/a - n/a, 2014.

2. **PONTES, N. E.**; BARBOSA, C. N.; JESUS, A. L. S.; SILVA, J. G.; FREITAS, A. C.
Development and Evaluation of Single-tube Nested PCR (STNPCR) for the Detection of Porcine Circovirus type 2 (PCV2). *Transboundary and Emerging Diseases (Print).*, v.61, p.233 - 238, 2014.

Artigos aceitos para publicação

1. SANTOS, E. U. D.; SILVA, M. A. R.; **PONTES, N. E.**; COUTINHO, L. C. A.; PAIVA, S. S. L.; CASTRO, R. S.; FREITAS, A. C.
Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases (Print).*, 2014.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. ANDRADE, M. A. S.; **PONTES, NAYARA E.**; TIBURCIO JUNIOR, E.; SILVA, A. M. S.; PESSOA JUNIOR, M. E.; FREITAS, ANTONIO C.
DETECTION AND EVALUATE OF OCCURRENCE OF Bovine Papilomavírus TYPES IN AN OVINE GROUP In: VII Sinanter - Simpósio Internacional de Diagnóstico e Terapêutica e X Jornada Científica do Lika, 2016, Recife.

VII Sinanter., 2016.

2. **PONTES, N.E.**; PONTES, N. E.; SILVA, A. M. S.; TIBURCIO JUNIOR, E.; PESSOA JUNIOR, M. E.; FREITAS, A.C.
Detecção de Papilomavírus bovino em lesões cutâneas e feto. In: V Jornada de Pós-Graduação em Genética, Recife.

V Jornada de Pós-Graduação em Genética., 2015.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **PONTES, N. E.**; TIBURCIO JUNIOR, E.; SILVA, A. M. S.; PESSOA JUNIOR, M. E.; CARRAZZONI, P. G.; FREITAS, A. C.

DETECÇÃO DE DNA DE DIFERENTES TIPOS DE BPVS EM AMOSTRAS DE TECIDOS REPRODUTIVOS, BEXIGA E FETO DE FÊMEAS BOVINAS ACOMETIDAS PELA PAPILOMATOSE, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

2. **PONTES, NAYARA E.**; SILVA, A. M. S.; TIBURCIO JUNIOR, E.; PESSOA JUNIOR, M. E.; FREITAS, A. C.

Deteção de Papilomavírus bovino em lesões cutâneas e feto, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Curso de aperfeiçoamento/especialização

1. FREITAS, A. C.; **PONTES, N.E.**; SILVA JUNIOR, A. H. P.; BRANDAO, J. M.

Participação em banca de Marcos Aurélio Souza de Andrade. **Deteção e Avaliação da ocorrência de tipos de Papilomavírus Bovino em um Grupo de Ovinos**, 2016
(Diagnóstico Molecular) Faculdade Pernambucana de Saúde

Graduação

1. BARBOSA, C. N.; **PONTES, NAYARA E.**; BARROS JUNIOR, M. R.; FREITAS, A.C.

Participação em banca de Priscila Rocha Duque. **Protocolo Moleculares em amostras clínicas de suínos para diagnósticos laboratoriais**, 2016
(Medicina Veterinária) Universidade Federal Rural de Pernambuco

2. REIS, C.R.S.; FREITAS, A.C.; **PONTES, NAYARA E.**

Participação em banca de Olívia Amorim. **Avaliação de Variantes do Oncogene E6 do Papilomavírus humano tipo 16 identificadas na região Nordeste do Brasil**, 2014
(Biomedicina) Universidade Maurício de Nassau

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	6
Artigos aceitos para publicação.....	1
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	17
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	7
Apresentações de trabalhos (Outra).....	1

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	5
Participações em eventos (seminário).....	5
Participações em eventos (simpósio).....	2
Participações em eventos (oficina).....	1
Participações em eventos (outra).....	3
Participação em banca de trabalhos de conclusão (curso de aperfeiçoamento/especialização).	1
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação).....	2