

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO**

**RACHEL SIQUEIRA DE QUEIROZ SIMÕES MARINS**

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS EM ANIMAIS ATRAVÉS DE  
TÉCNICAS MOLECULARES E CITOGENÉTICAS**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES  
2008**

**RACHEL SIQUEIRA DE QUEIROZ SIMÕES MARINS**

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS EM ANIMAIS ATRAVÉS DE  
TÉCNICAS MOLECULARES E CITOGENÉTICAS**

**Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na Área de Concentração de Sanidade Animal.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Denise Monnerat Nogueira**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES  
2008**

**RACHEL SIQUEIRA DE QUEIROZ SIMÕES MARINS**

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS EM ANIMAIS ATRAVÉS DE  
TÉCNICAS MOLECULARES E CITOGENÉTICAS**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal, na Área de Concentração de Sanidade Animal.

Aprovada em 9 de outubro de 2008.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Denise Monnerat Nogueira (Doutora, Biociências Nucleares) - UFF

---

Prof<sup>a</sup>. Anna Lvovna Okorokova Façanha (Doutora, Química Biológica) - UENF

---

Prof. Olney Vieira da Motta (Doutor, Biociências e Biotecnologia) - UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira (Doutora, Microbiologia) - UENF  
(Orientadora)

**Esta tese é dedicada aos jovens pesquisadores brasileiros que buscam, em nome da Ciência, o saber científico na área de Oncologia Viral visando à cura.**

## **AGRADECIMENTOS**

À divindade eterna, pelas bênçãos concedidas e alcançadas.

A minha grandiosa família: meus pais, Silman e Izabel Simões, meus queridos irmãos, Felipe e Juliana Simões, por todo o apoio, incentivo e carinho imprescindíveis para a conclusão de mais uma etapa na minha vida, em especial, ao meu amado filho Arthur e marido Sandro Marins pela compreensão e amor sempre presentes.

À Dr<sup>a</sup>. Sandra Berardinelli, pela inestimável escuta e orientação psicanalítica fruto de um longo trabalho em busca do saber.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira, que vem acompanhando minha trajetória desde meu ingresso na pós-graduação, agradeço pelo seu estímulo, apoio e orientação na realização desse trabalho.

Às minhas coorientadoras, Dr<sup>a</sup>. Rita de Cassia Stocco dos Santos e Prof<sup>a</sup>. Denise Monnerat Nogueira, pela grande oportunidade e acolhida em seus laboratórios, indispensáveis treinamentos na aplicação das técnicas moleculares e citogenética e eficiente orientação nas etapas desenvolvidas.

À Coordenação da Pós-graduação e Diretoria do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pelo apoio administrativo e, em especial, aos funcionários André, Etiene e Jovana, pelo auxílio sempre prestado.

Ao graduando Christiano Reis, pelo acompanhamento na colheita do material, e a todos os proprietários por disponibilizarem seus animais para fazerem parte deste estudo.

Aos pesquisadores, Prof. Victor Martin, do Laboratório de Biotecnologia do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), e Prof. Eulógio Carlos Queirós de Carvalho, do Setor de Anatomia Patológica do Laboratório de Sanidade Animal LSA – CCTA/HV, desta instituição, pela participação como membros titulares na banca examinadora do projeto de tese, e colaboração como revisores nos estudos moleculares e histopatológicos.

À Dr<sup>a</sup>. Keila Mara Cassiano, chefe do Laboratório de Estatística do Instituto de Matemática da Universidade Federal Fluminense, pela análise estatística de resultados citogenéticos.

Aos membros da banca do exame de qualificação, Dr. Claudemir de Carvalho, Dr<sup>a</sup>. Beatriz Goldshmidt e Dr<sup>a</sup>. Ana Beatriz Garcia, pelas competentes e minuciosas sugestões nas apresentações e, em particular, pelos valiosos comentários quanto aos experimentos desta tese.

À equipe do Laboratório de Genética do Instituto Butantan, pelo agradável convívio que me proporcionaram e, em especial, aos pós-graduandos Dalton Giovanni e Sérgio Campos, pelo acompanhamento nas técnicas moleculares realizadas.

À equipe do Laboratório de Citogenética Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, pelos agradáveis momentos e, em especial, às graduandas Tábata Maués e Viviane Dias, pela colaboração no preparo das culturas e análise das metáfases.

À equipe do Setor de Virologia e Víruses do LSA – CCTA/HV da UENF, em particular, aos doutorandos Luiz Fernando Vieira e Carla Nascimento Chicarino, pelo apoio e companheirismo ao longo desses anos.

À equipe Setor de Morfologia e Anatomia Patológica do LSA – CCTA/HV da UENF, pela confecção dos cortes histológicos, em especial, à doutoranda Lio Moreira, pelo apoio e acompanhamento das análises histopatológicas.

Ao Dr. Heitor Herrera do Laboratório de Tripanossomatídeos e à Dra. Beatriz Goldschmidt do Centro de Criação de Animais de Laboratório, ambos da Fundação Oswaldo Cruz, por cederem amostras silvestres dos javalis e primata.

Ao Dr. Mozar Lemos, veterinário responsável pela Estação do Avestruz e ao Dr. Leopoldo José Cury, veterinário chefe na Vila Taterssal do Jockey Club Brasileiro e professor na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, pelo consentimento da colheita de amostras sanguíneas.

Ao Dr. Luiz Paulo Luzes Fedullo, chefe do departamento de veterinária da Fundação Jardim Zoológico do Rio de Janeiro, pela colaboração no manejo de animais silvestres para colheita de biópsias e amostras sanguíneas.

Ao Dr. Lério Gama Sales, exemplo de veterinário clínico e cirurgião de grandes animais, pelos ensinamentos na colheita do material e incentivo à escolha do vírus estudado.

À Dra. Maria Angélica, clínica de pequenos animais do Hospital Veterinário desta instituição, e ao Dr. Rafael Corrêa, diretor do Laboratório de Análises Clínicas, pela colaboração em ceder algumas amostras sanguíneas de caninos atendidos em suas consultas de rotina, e à doutoranda Sabina, em ceder algumas amostras de plama de bubalinos.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, pela credibilidade no término deste trabalho com bolsa concedida.

A todos os pesquisadores, professores, pós-graduandos, graduandos e amigos que acompanharam e contribuíram para a realização deste trabalho de caráter multidisciplinar e coletivo, meus sinceros agradecimentos.

**“O gênio é composto por 2% de talento e  
por 98% de perseverante aplicação.”  
(Ludwig van Beethoven)**



## RESUMO

Recentemente, os papilomavírus têm sido classificados na família *Papillomaviridae* e novos gêneros foram descritos baseados na similaridade filogenética interespecies. O papilomavírus é um vírus DNA que induz à formação de neoplasias benignas e malignas em uma vasta gama de hospedeiros. O objetivo central deste trabalho foi detectar a presença do papilomavírus em diversas espécies de animais e pesquisar possíveis alterações cromossômicas induzidas pela interação do genoma viral à cromatina da célula hospedeira. Foram incluídos na pesquisa: bovinos, bubalinos, equinos, suínos, ovinos, caninos, onças, araras e avestruzes. Foram selecionados 86 animais de espécies variadas sem sinais clínicos de lesão epitelial, em média 10 animais por espécie analisada, e 20 animais com esses sinais clínicos: 10 bovinos, três caninos, três equinos e quatro animais silvestres. O DNA genômico foi extraído de amostras sanguíneas e de biópsias epiteliais de animais que apresentaram ou não sinais clínicos. Foi excluída do estudo a espécie *Bubalus bubalis*, porque apenas um, entre 12 bubalinos, apresentou DNA viável após extração. Seguiu-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o par de oligonucleotídeos degenerados FAP59/FAP64 desenhado para a amplificação do gene L1 do capsídeo viral, o qual é conservado em todos os papilomavírus. Sequências de DNA do genoma viral foram detectadas em amostras das espécies *Canis familiaris*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Panthera onca*, *Felis concolor*, *Ara macao*, *Ara chloroptera* e *Struthio camelus*. Não foram detectadas bandas amplificadas nas amostras de *Sus domesticus*, *Sus scrofa* e *Equus caballus*. Após seleção das amostras, os produtos da PCR foram purificados e posteriormente sequenciados. Pela análise e alinhamento das sequências dos nucleotídeos das amostras selecionadas foi possível identificar a similaridade genética com diferentes hospedeiros do papilomavírus, de acordo com as sequências depositadas no banco de dados. As amostras tumorais obtidas, a partir de biópsias de *Sus scrofa*, *Panthera leo*, *Ara araruna*, *Bos taurus*, *Macaca fascicularis* e *Canis familiaris*, foram diagnosticadas histologicamente como melanoma, epúlida fibromatosa, formações nodulares, papilomas e adenocarcinomas, respectivamente. As lesões papilomatosas e adenocarcinomas apresentaram bandas amplificadas referentes à infecção viral

e foram submetidas à análise citogenética por culturas das lesões. Também foram implantadas culturas de linfócitos do sangue periférico de *Bos taurus*, *Equus caballus* and *Canis familiaris* afetados clinicamente. Foram verificadas aberrações cromossômicas estruturais, tais como, associações, fragmentos cromossômicos, fusões cêntricas, cromátides abertas, “gaps”, rearranjos e anéis. Em ambas as culturas, foram observadas sobreposições cromossômicas e, principalmente, nas culturas de lesões, diversos níveis de condensação de cromossomos prematuros foram observados. Anomalias numéricas, também foram detectadas e as células hipoloides foram encontradas em maior número do que as células hiperploides. A análise citogenética foi realizada pela primeira vez em caninos e equinos com sinais clínicos do papilomavírus.

Palavras-chave: papilomavírus, animais, neoplasias, cromossomos, detecção viral.

## ABSTRACT

Recently, the papillomaviruses have been classified in the family *Papillomaviridae* and new genera were described on the basis in the interspecies phylogenetic similarity. The papillomavirus is a DNA virus that induces the formation of benign and malignant tumors in a vast range of hosts. The central goal of this work was to detect the presence of the papillomavirus in several species of animals and to evaluate possible chromosomal abnormalities induced by the interaction of the viral genome with the chromatin of the host cell. Bovines, bison, equines, swines, ovines, canines, jaguar, macaws and ostriches were included in the research. They were selected 86 animals of several species without clinical signs of epithelial lesion, average of 10 animals per analyzed species, and, 20 animals without these clinical signs, 10 bovines, three canines, three equines and four wild animals. Genomic DNA was extracted from blood samples and epithelial biopsy of animals presenting or no clinical signs. *Bubalus bubalis* was excluded, because one of 10 bubalis presented viable DNA after extraction. Followed by PCR using degenerated primer pair FAP59/FAP64 designed for the amplification of the gene L1 of the viral capsid, which is conserved in all of the papillomavirus. DNA sequences of the viral genome were detected in samples of *Canis familiaris*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Panthera onca*, *Felis concolor*, *Ara macao*, *Ara chloroptera* and *Struthio camelus*. Amplification bands were not detected in the samples of *Sus domesticus*, *Sus scrofa* e *Equus caballus*. After selection of the samples, PCR products were purified and sequenced. By the analysis and alignment of the nucleotides sequences of the selected samples was possible to identify the genetic similarity with different hosts of the papillomavirus according to the sequences deposited in the database. The tumors samples obtained from biopsy of *Sus scrofa*, *Panthera leo*, *Ara araruna*, *Bos taurus*, *Macaca fascicularis* and *Canis familiaris* were verified histologically as melanom, epulid fibromatous, nodular formations, papillomas and adenocarcinomas, respectively. Such papilloma and adenocarcinoma lesions presented positive amplified bands for the viral infection. They were submitted to the analysis cytogenetics for the tumor cultures. Peripheral blood lymphocyte cultures were also obtained from *Bos taurus*, *Equus caballus* and *Canis familiaris* clinically affected. Structural chromosomal

aberrations were verified as associations, chromosomal fragments, centric fusions, open chromatids, gaps, rearrangements and rings. In both cultures were observed several levels of premature condensation in chromosomes especially in the lesions cultures. Numeric abnormalities as aneuploidy were also detected and hypodiploid cells were found in larger number than the hyperdiploid cells. The analysis cytogenetics was achieved for the first time in canines and equines with clinical signs of papillomavirus.

Key words: papillomavirus, animals, tumors, chromosomes, viral detection.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Árvore filogenética de papilomavírus animal e humano.....42
- Figura 2.** Morfologia do papilomavírus.....44
- Figura 3.** Mapa genômico do BPV-1 (*Bovine papillomavirus 1*).....49
- Figura 4.** Aberração cromossômica detectada em cultura de linfócitos de curta duração obtidos de consumidores de *Pteridium aquilinum*.....72
- Figura 5.** Aberrações cromossômicas estruturais em metáfase obtida a partir de cultura de curta duração dos linfócitos do sangue periférico de bovino.....73
- Figura 6.** Célula do oncogene E7 do *Bovine papillomavirus 4* (BPV-4) associado ao gene ras (E7R) e célula do oncogene E7 do BPV-4 associado à queratina (E7Q).....75
- Figura 7.** Célula de cromossomos condensados prematuramente (PCC) semelhante à prófase observado em células *HeLa*.....76
- Figura 8.** Cromossomos condensados prematuramente (PCC).....78
- Figura 9.** Cromossomos condensados prematuramente (PCC) semelhantes à prófase.....79
- Figura 10.** Inibição do *checkpoint 1* ou da enzima reparadora ATR exibindo células de cromossomos condensados prematuramente (PCC) em baixas doses de quebra de DNA ou resultantes da interrupção da divisão celular na fase S.....81
- Figura 11.** Cariótipo normal de bovino macho com bandamento G (2n = 60, XY)...82

<b>Figura 12.</b> Cariótipo normal de equino fêmea ( $2n = 64, XX$ ).....	83
<b>Figura 13.</b> Cariótipo normal de canino macho ( $2n = 78, XY$ ).....	84
<b>Figura 14.</b> Eletroforese em gel de agarose a 2% das amostras dos bovinos para PCR $\beta$ -globina.....	141
<b>Figura 15.</b> Eletroforese em gel de agarose a 2% das amostras de DNA de animais obtidas a partir de sangue e amplificadas por PCR para detecção do papilomavírus.....	141
<b>Figura 16.</b> Eletroforese em gel de agarose a 2% das amostras de DNA das aves obtidas a partir de sangue e amplificadas por PCR para detecção do papilomavírus .....	142
<b>Figura 17.</b> Eletroforese em gel de agarose a 2% das amostras de DNA de caninos obtidas a partir de sangue e amplificadas por PCR para detecção do papilomavírus.....	142
<b>Figura 18.</b> Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos purificados por PCR a partir de DNA extraído de amostras sanguíneas de animais silvestres para detecção do papilomavírus.....	143
<b>Figura 19.</b> Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos amplificados por PCR a partir de DNA extraído de amostras sanguíneas de caninos para detecção do papilomavírus.....	144
<b>Figura 20.</b> Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos purificados por PCR a partir de DNA extraído de amostras sanguíneas de ovinos e caninos para detecção do papilomavírus.....	144
<b>Figura 21.</b> Classificação das metáfases com número diploide normal, aumentado (hiperploide) ou diminuído (hipoploide) quanto ao número de cromossomos.....	156

<b>Figura 22.</b> Aberrações estruturais na cultura de linfócito do sangue periférico de bovinos.....	157
<b>Figura 23.</b> Condensação prematura dos cromossomos (PCC) na cultura de linfócito do sangue periférico de bovinos.....	158
<b>Figura 24.</b> Rearranjos cromossômicos observados em análise citogenética de cultura de linfócitos de sangue periférico de bovinos.....	159
<b>Figura 25.</b> Estágios da condensação prematura dos cromossomos.....	160
<b>Figura 26.</b> Anomalias cromossômicas observadas em metáfases obtidas a partir da cultura de linfócitos do sangue periférico de caninos.....	162
<b>Figura 27.</b> Célula hipoploide e morfologias dos cromossomos condensados prematuramente (PCC) na cultura de linfócitos do sangue periférico de caninos.....	163
<b>Figura 28.</b> Alterações numéricas e estruturais nos cromossomos obtidos a partir da cultura de linfócitos do sangue periférico de equino.....	165
<b>Figura 29.</b> Proporção média dos tipos de metáfases nos grupos animais.....	167
<b>Figura 30.</b> Proporção média de metáfases e PCC nos grupos animais.....	168
<b>Figura 31.</b> Alterações histológicas da papilomatose cutânea em bovino.....	171
<b>Figura 32.</b> Alterações histológicas da papilomatose cutânea bovina e da papilomatose na mucosa oral de primata.....	172

## LISTAS DE TABELAS

- Tabela 1.** Aspectos taxonômicos importantes da família *Papillomaviridae*, segundo referência do Comitê Internacional sobre Taxionomia Viral.....36
- Tabela 2.** Achados taxionômicos de novos papilomavírus ainda não classificados pelo ICTV.....38
- Tabela 3.** Achados epidemiológicos de lesões em felídeos positivos para infecção pelo papilomavírus.....58
- Tabela 4.** Achados epidemiológicos de fibropapilomas mucocutâneos em camelídeos.....65
- Tabela 5.** Descrição do padrão cariotípico de caninos, bovinos e equinos domésticos.....85
- Tabela 6.** Características dos tipos virais do papilomavírus em bovinos.....95
- Tabela 7.** Similaridade das sequências dos nucleotídeos dos novos prováveis tipos de papilomavírus de bovino (*Bovine alimentary papillomavirus* – BAPV) estritamente relacionados com estes e BPVs.....96
- Tabela 8.** Comparação dos tamanhos dos amplicons gerados quanto às espécies e o par de *primers* utilizados na reação de PCR.....98
- Tabela 9.** Dados dos animais *Bos taurus* no estudo da infecção viral assintomática.....112



<b>Tabela 10.</b> Dados dos animais <i>Bubalus bubalis</i> no estudo da infecção viral assintomática.....	113
<b>Tabela 11.</b> Dados dos animais <i>Equus caballus</i> no estudo da infecção viral assintomática.....	114
<b>Tabela 12.</b> Dados dos animais <i>Ovis aries</i> no estudo da infecção viral assintomática.....	115
<b>Tabela 13.</b> Dados dos animais <i>Sus domesticus</i> no estudo da infecção viral assintomática.....	116
<b>Tabela 14.</b> Dados dos animais <i>Canis familiaris</i> no estudo da infecção viral assintomática.....	117
<b>Tabela 15.</b> Dados dos animais <i>Struthio camelus</i> no estudo da infecção viral assintomática.....	118
<b>Tabela 16.</b> Dados dos animais <i>Sus scrofa</i> no estudo da infecção viral assintomática.....	119
<b>Tabela 17.</b> Dados dos animais <i>Ara ararauna</i> , <i>Ara macao</i> e <i>Ara chloroptera</i> no estudo da infecção viral assintomática.....	120
<b>Tabela 18.</b> Dados dos animais <i>Panthera onca</i> e <i>Felis concolor</i> no estudo da infecção viral assintomática.....	121
<b>Tabela 19.</b> Dados dos animais <i>Bos taurus</i> no estudo da infecção viral clínica.....	122

<b>Tabela 20.</b> Dados dos animais <i>Equus caballus</i> no estudo da infecção viral clínica.....	123
<b>Tabela 21.</b> Dados dos animais <i>Canis familiaris</i> no estudo da infecção viral clínica.....	123
<b>Tabela 22.</b> Dados dos animais silvestres <i>Sus scrofa</i> , <i>Ara ararauna</i> , <i>Panthera leo</i> , <i>Macaca fascicularis</i> no estudo da infecção viral clínica.....	126
<b>Tabela 23.</b> Sequências de nucleotídeos e tamanho do fragmento esperado de acordo com os iniciadores dianteiro e reverso.....	130
<b>Tabela 24.</b> Comparação dos tamanhos dos amplicons gerados quanto às espécies diversificadas.....	140
<b>Tabela 25.</b> Número de metáfases completas, com alterações numéricas e células com condensação prematura dos cromossomos (PCC), encontradas na cultura de linfócitos do sangue periférico de bovinos com papilomatose.....	154
<b>Tabela 26.</b> Frequência das células analisadas com aberrações cromossômicas estruturais nos linfócitos do sangue periférico de bovinos com papilomatose e dieta livre da samambaia do campo.....	155
<b>Tabela 27.</b> Número de metáfases completas, com alterações numéricas e células com condensação prematura dos cromossomos (PCC), na cultura de linfócitos do sangue periférico de caninos com lesões cutâneas.....	161
<b>Tabela 28.</b> Frequência das células analisadas com aberrações cromossômicas estruturais nos linfócitos do sangue periférico de caninos com lesões cutâneas.....	162

<b>Tabela 29.</b> Número de metáfases completas, com alterações numéricas e células com condensação prematura dos cromossomos (PCC), encontradas na cultura de linfócitos do sangue periférico de equinos com papilomatose.....	164
<b>Tabela 30.</b> Frequência das células analisadas com aberrações cromossômicas estruturais nos linfócitos do sangue periférico de equinos com papilomatose.....	164
<b>Tabela 31.</b> Características citogenéticas dos grupos estudados.....	169
<b>Tabela 32.</b> Casuística de acordo com o diagnóstico histopatológico das dermatopatias.....	170

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>%</b>	Porcentagem
<b>2n</b>	Número diploide
<b>μL</b>	microlitro
<b>μM</b>	micromolar
<b>α</b>	alfa
<b>β</b>	beta
<b>γ</b>	gamma
<b>δ</b>	delta
<b>ε</b>	epsilon
<b>ζ</b>	zeta
<b>η</b>	eta
<b>θ</b>	theta
<b>ι</b>	iota
<b>κ</b>	kappa
<b>λ</b>	lambda
<b>μ</b>	mu
<b>ν</b>	nu
<b>ξ</b>	xi
<b>ο</b>	omicron
<b>π</b>	pi
<b>A</b>	adenina
<b>A</b>	acrocêntrico
<b>Ae</b>	sítio precoce
<b>AE</b>	tampão de eluição
<b>AI</b>	sítio tardio
<b>AL</b>	tampão de lise
<b>APV</b>	<i>Avian papillomavirus</i>
<b>ATL</b>	tampão de lise tecidual
<b>ATR</b>	Enzima relação Rad3
<b>AW</b>	tampão de lavagem
<b>bp</b>	pares de base

<b>BioEdit</b>	<i>Biological Sequence Alignment Editor</i>
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>BAAV</b>	<i>Bovine adeno-associated virus</i>
<b>BAPV</b>	<i>Bovine alimentary papillomavirus</i>
<b>BPV</b>	<i>Bovine papillomavirus</i>
<b>C</b>	Centrômero
<b>CBG</b>	Centrômero giemsa bário
<b>CCE</b>	Carcinoma de células escamosas
<b>CCTA</b>	Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias
<b>CE</b>	Constitutivo propulsor transcricional
<b>CECAL</b>	Centro de Criação de Animais de Laboratório
<b>CdK</b>	Ciclina dependente de kinase
<b>CgPV</b>	<i>Colubus guerezae papillomavirus</i>
<b>ChPV</b>	<i>Chaffinch papillomavirus</i>
<b>ChPV-1</b>	<i>Capra hircus papillomavirus</i>
<b>cm</b>	centímetros
<b>COPV</b>	<i>Canine oral papillomavirus</i>
<b>CPT</b>	Camptotecina
<b>CRA</b>	<i>Chromosome resolution additive</i>
<b>CRPV</b>	<i>Cottontail rabbit papillomavirus</i>
<b>CsCl</b>	Cloreto de Césio
<b>CV</b>	Coeficiente de variação
<b>DEPRIM</b>	Departamento de Primatologia
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
<b>DPV</b>	<i>Deer papillomavirus</i>
<b>E</b>	<i>Early</i>
<b>E7R</b>	Oncogene E7 associado ao oncogene Ras
<b>E7Q</b>	Oncogene E7 associado à quercetina
<b>EBV</b>	<i>Epstein-barr virus</i>
<b>ECPV-1</b>	<i>Equine papillomavirus 1</i>
<b>ECPV</b>	<i>Equus caballus papillomavirus</i>
<b>EdPV</b>	<i>Erethizon dorsatum papillomavirus</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>EEPV</b>	<i>European elk papillomavirus</i>

<b>EPV</b>	<i>Elephant papillomavirus</i>
<b>EV</b>	Epidermodisplasia verruciforme
<b>F</b>	Fêmea
<b>FcPV</b>	<i>Felis concolor papillomavirus</i>
<b>FdPV</b>	<i>Feline papillomavirus</i>
<b>FdPV-1</b>	<i>Felis domesticus papillomavirus 1</i>
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FISH</b>	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
<b>FPV</b>	<i>Fringilla coelebs papillomavirus</i>
<b>FvPV</b>	<i>Felis rufus papillomavirus</i>
<b>G</b>	Giemsa
<b>g</b>	Grama
<b>G1</b>	Fase G1 do ciclo celular
<b>G2</b>	Fase G2 do ciclo celular
<b>GTG</b>	Giemsa tripsina giemsa
<b>H1</b>	Histona 1
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HaOPV</b>	<i>Hamster oral papillomavirus</i>
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>HeLa</b>	Cultura de células cancerosas humanas Henrietta Lacks
<b>HPV</b>	<i>Human papillomavirus</i>
<b>HV</b>	Hospital Veterinário
<b>IA</b>	Inseminação artificial
<b>ICTV</b>	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>Kbp</b>	Kilos pares de base
<b>KoPV</b>	<i>Koala papillomavirus</i>
<b>L</b>	<i>Late</i>
<b>LCR</b>	<i>Long Control Region</i>
<b>M</b>	Macho
<b>m<sup>2</sup></b>	metro quadrado
<b>MfPV</b>	<i>Macaca fascicularis papillomavirus</i>
<b>MgCL<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>mg</b>	Miligrama

<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MmPV</b>	<i>Micromys minutus papillomavirus</i>
<b>MmPV</b>	<i>Multimammate mouse papillomavirus</i>
<b>MMS</b>	Metil metano sulfanato
<b>MnPV</b>	<i>Mastomys natalensis papillomavirus</i>
<b>N</b>	Normal
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<b>ng</b>	Nanograma
<b>NnPV</b>	<i>Neofelis nebulosa papillomavirus</i>
<b>ORF</b>	<i>Open Reading Frames</i>
<b>OvPV</b>	<i>Ovine papillomavirus</i>
<b>p</b>	proteína
<b>PcPV</b>	<i>Pigmy chimpanzee papillomavirus</i>
<b>PCC</b>	<i>Premature chromosome condensation</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PePV</b>	<i>Psittacus erithacus timneh papillomavirus</i>
<b>pH</b>	Concentração hidrogeniônica
<b>PIPV</b>	<i>Panthera leo persica papillomavirus</i>
<b>PIPV-1</b>	<i>Procyon lotor papillomavirus type 1</i>
<b>pMol</b>	Picomole
<b>PoPV</b>	<i>Possum papillomavirus</i>
<b>pRB</b>	Proteína do retinoblastoma
<b>PSI</b>	Puro Sangue Inglês
<b>PsPV</b>	<i>Phocoena spinipinnis papillomavirus</i>
<b>PuPV</b>	<i>Panthera uncia papillomavirus</i>
<b>PV</b>	Papilomavírus
<b>q.s.p.</b>	quantidade suficiente para
<b>RaPV</b>	<i>Rousettus aegyptiacus papillomavirus</i>
<b>RB</b>	Retinoblastoma
<b>RCA</b>	<i>Rolling-circle amplification</i>
<b>RhPV</b>	<i>Rhesus monkey papillomavirus</i>

<b>RIOZOO</b>	Fundação Jardim Zoológico do Rio de Janeiro
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido ribonucléico mensageiro
<b>ROPV</b>	<i>Rabbit oral papillomavirus</i>
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>RPV</b>	<i>Reindeer papillomavirus</i>
<b>S</b>	Síntese
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<b>SM</b>	Submetacêntrico
<b>sp</b>	Espécie
<b>SSC</b>	Salina citrato de sódio
<b>SV40</b>	Simian vírus 40
<b>T</b>	Timina
<b>TAE</b>	Tampão Tris-ácido acético-EDTA
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>Th1</b>	Células T helper 1
<b>TmIPV</b>	<i>Trichechus manatus latirostris papillomavirus</i>
<b>TmPV-1</b>	<i>Trichechus manatus latirostris papillomavirus type 1</i>
<b>TtPV</b>	<i>Tursiops truncatus papillomavirus</i>
<b>TvPV</b>	<i>Trichosurus vulpecula papillomavirus</i>
<b>UENF</b>	Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
<b>UmPV-1</b>	<i>Ursus maritimus papillomavirus type 1</i>
<b>URR</b>	<i>Upstream regulatory region</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VLP</b>	<i>Particles virus-like</i>
<b>W</b>	Watts



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	33
3.1. Histórico.....	33
3.2. Taxonomia viral.....	35
3.3. Evolução filogenética do vírus.....	39
3.4. Propriedades físicas, químicas e biológicas do vírus.....	43
3.5. Replicação e biossíntese de macromoléculas virais.....	45
3.6. Genoma e homologia interespecies.....	50
3.6.1. No papilomavírus em macacos Rhesus.....	50
3.6.2. Nos papilomavírus de cervos, veados e alces europeus.....	51
3.6.3. No papilomavírus do passeriforme <i>Fringilla coelebs</i> .....	52
3.7. Epidemiologia.....	54
3.7.1. Epidemiologia em animais domésticos.....	56
3.7.2. Epidemiologia em animais silvestres.....	62
3.8. Correlação genética entre os tipos e diferentes hospedeiro do papilomavírus.....	66
3.9. Técnicas de análise citogenética.....	69
3.9.1. Técnicas de bandamento cromossômico.....	70
3.9.1.1. Bandamento G ou método de coloração GTG.....	70
3.9.1.2. Bandamento C ou método de coloração CBG.....	71
3.9.2. Análise citogenética em animais domésticos e humanos infectados pelo papilomavírus.....	71
3.9.3. Mecanismos do efeito citopático e regulação dos <i>Checkpoints</i> mitóticos.....	75
3.9.4. Descrição do complemento cromossômico de bovinos, caninos e equinos.....	81
3.10. Modelos animais.....	85
3.11. Sinais clínicos e lesões da virose.....	87
3.11.1. Sinais clínicos e lesões da virose em animais domésticos.....	88
3.11.2. Sinais clínicos e lesões da virose em animais silvestres.....	100

3.12. Resposta imune à infecção viral.....	101
3.13. Cofatores.....	104
3.14. Diagnóstico.....	104
3.15. Medidas preventivas.....	106
3.16. Tratamento.....	107
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>110</b>
4.1. Distribuição geográfica e procedência das espécies animais.....	110
4.2. Locais de execução dos experimentos.....	110
4.3. Colheita de amostras.....	111
4.3.1. Amostras de lesões epiteliais.....	111
4.3.2. Amostras de sangue total.....	111
4.3.3. Animais.....	112
4.3.3.1. Estudo da infecção viral assintomática.....	112
4.3.3.1.1. Animais domésticos.....	112
4.3.3.1.1.1. Bovinos.....	112
4.3.3.1.1.2. Bubalinos.....	113
4.3.3.1.1.3. Equinos.....	114
4.3.3.1.1.4. Ovinos.....	115
4.3.3.1.1.5. Suínos.....	115
4.3.3.1.1.6. Caninos.....	116
4.3.3.1.1.7. Avestruzes.....	117
4.3.3.1.2. Animais silvestres.....	118
4.3.3.1.2.1. Suínos.....	118
4.3.3.1.2.2. Araras.....	119
4.3.3.1.2.3. Onças.....	120
4.3.3.2. Estudo da infecção viral clínica.....	121
4.3.3.2.1. Animais domésticos.....	121
4.3.3.2.1.1. Bovinos.....	121
4.3.3.2.1.2. Equinos.....	122
4.3.3.2.1.3. Caninos.....	123
4.3.3.2.2. Animais silvestres.....	124
4.3.3.2.2.1. Suíno selvagem.....	124
4.3.3.2.2.2. Arara.....	124

4.3.3.2.2.3. Leão.....	124
4.3.3.2.2.4. Primata.....	125
4.4. Métodos diagnósticos .....	126
4.4.1. Análise molecular.....	126
4.4.1.1. Extração do DNA total a partir das amostras sanguíneas.....	126
4.4.1.2. Extração do DNA total a partir das amostras teciduais .....	127
4.4.1.3. Análise da qualidade e quantidade do DNA genômico.....	128
4.4.1.4. Avaliação da qualidade do DNA genômico pela PCR do gene $\beta$ -globina.....	128
4.4.1.5. Procedimento da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	128
4.4.1.6. Procedimentos técnicos de purificação das amostras selecionadas.....	130
4.4.1.7. Procedimentos técnicos de purificação das amostras purificadas.....	130
4.4.1.8. Sequenciamento.....	131
4.4.2. Estudo citogenético.....	132
4.4.2.1. Cultura de linfócitos do sangue periférico.....	132
4.4.2.2. Cultura das lesões cutâneas.....	133
4.4.2.3. Técnica de coloração convencional dos cromossomos.....	134
4.4.2.4. Análise das metáfases e montagem dos cariótipos.....	134
4.4.2.5. Técnica de bandamento cromossômico.....	135
4.4.2.5.1. Bandamento G ou método de coloração GTG.....	135
4.4.2.5.2. Bandamento C ou método de coloração CBG.....	135
4.4.2.6. Análise estatística dos dados citogenéticos.....	136
4.4.3. Histopatologia.....	136
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>138</b>
5.1. Estudos moleculares.....	138
5.1.1. Amplificação dos produtos da reação de PCR.....	138
5.1.2. Purificação e quantificação de produtos da PCR.....	143
5.1.3. Sequenciamento de produtos da PCR.....	145
5.1.4. Análise e alinhamento das sequências dos nucleotídeos.....	145
5.2. Estudos citogenéticos.....	153
5.2.1. Análise cromossômica nos bovinos.....	153
5.2.1.1. Análise das metáfases obtidas por cultura de linfócitos do sangue periférico.....	153

5.2.1.2. Cultura das lesões cutâneas.....	159
5.2.2. Análise cromossômica nos caninos.....	160
5.2.2.1. Análise das metáfases obtidas por cultura de linfócitos do sangue periférico.....	160
5.2.3. Análise cromossômica nos equinos.....	163
5.2.3.1. Análise das metáfases obtidas por cultura de linfócitos do sangue periférico.....	163
5.2.4. Técnicas de bandamento cromossômico.....	165
5.2.5. Análise estatística dos dados citogenéticos.....	165
5.3. Histopatologia.....	169
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>173</b>
6.1. Análise molecular.....	173
6.2. Análise citogenética.....	183
6.3. Análise histopatológica.....	188
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>192</b>
<b>8. RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>194</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>196</b>
<b>10. APÊNDICES.....</b>	<b>212</b>
APÊNDICE A - Preparo das soluções de citogenética.....	212
APÊNDICE B - Preparo das soluções de histopatologia.....	214
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>217</b>
ANEXO A – Protocolo de colheita do material.....	217
ANEXO B – Protocolo de conservação do material.....	218
ANEXO C – Protocolo de transporte do material.....	219
ANEXO D – Documento de registro da procedência dos animais.....	220
ANEXO E – Requisição de exames.....	221
ANEXO F – Ficha dos animais.....	222
ANEXO G – Identificação das amostras.....	223

## 1. INTRODUÇÃO

O papilomavírus (PV) é um vírus com genoma constituído por ácido desoxirribonucléico (DNA) de fita dupla, que apresenta tropismo pela superfície epiteliotrópica e mucosotrópica, espécie-específico e com uma vasta gama de hospedeiros. A papilomatose, uma das doenças causadas pelo PV, caracteriza-se por lesões benignas ou malignas, conhecidas como papilomas ou “verrugas”. Frequentemente, o PV induz a proliferação das lesões localizadas em tecidos específicos, com achados clínicos e microscópicos típicos da virose neoplásica. O tecido epitelial, a mucosa oral, a mucosa anogenital e o trato urogenital podem ter malignização, aparentemente, dependente da interação entre o vírus e cofatores ambientais, tais como: a ação de substâncias carcinogênicas da samambaia do campo (*Pteridium aquilinum*), radiação solar, hábitos alimentares, entre outros. Portanto, o PV apresenta um potencial oncogênico.

De acordo com o Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV*), na árvore filogenética dos papilomavírus (PVs), identificam-se cinco supergrupos ordenados em A, B, C, D e E, nos quais se enquadram espécies e tipos virais, que acometem o homem e diferentes espécies animais. Recentes estudos têm analisado lesões indicativas de papilomatose em espécies de animais silvestres, como papagaio (*Amazona aestiva*), tartaruga de couro (*Caretta caretta*), tartaruga verde (*Chelonia mydas*), iguana verde (*Iguana iguana*) e golfinho (*Phocoena spinipinnis*), entre outras. No “peixe-boi” (*Trichechus manatus latirostris*), de vida livre e de cativeiro, evidências moleculares da associação do papilomavírus com lesões cutâneas microscópicas indicativas de papilomatose e a presença de numerosas partículas virais intranucleares têm sido demonstradas.

Lesões papilomatosas relacionadas ao PV têm sido caracterizadas por regressão, persistência e progressão. A infecção pelo PV pode apresentar-se completamente assintomática e os linfócitos do sangue periférico são sugeridos como sítio de “latência” para o vírus. Por outro lado, a papilomatose pode estar associada a cepas virais carcinogênicas e evoluir para a malignidade. Em função da possibilidade de lesões papilomatosas evoluírem para neoplasias malignas, cresce a

necessidade do conhecimento sobre a oncogênese viral e de um diagnóstico precoce para a infecção, com vistas ao tratamento efetivo.

Recentemente, efeitos dramáticos da ação de oncoproteínas do papilomavírus bovino (*Bovine papillomavirus* – BPV) nas células de bovinos têm sido relatados. PVs têm sido detectados no desenvolvimento de tumores malignos em humanos e animais, embora a maioria das lesões papilomatosas seja benigna e bem delimitada. Algumas lesões papilomatosas regridem espontaneamente, outras se mostram resistentes aos tratamentos empregados. O impacto das infecções benignas pelo PV é maior nos indivíduos imunossuprimidos terapeuticamente ou coinfectados por outros vírus. Na medida em que avançam os estudos nesta área, a alta incidência das infecções pelo PV, a gravidade das lesões papilomatosas e diferentes experimentos em animais desafiados para combater o vírus têm contribuído, de certa forma, para o entendimento da biologia e imunidade associada à infecção viral.

Frequentemente, os estudos têm focado a papilomatose animal como modelo para estabelecer métodos efetivos de prevenção e tratamento da virose em humanos. O desenvolvimento de uma vacina eficaz no controle do PV, na espécie bovina, já se encontra em estudo avançado por pesquisadores brasileiros. Para tal, as principais medidas consistem em estabelecer as formas de transmissão viral e determinar os tipos virais prevalentes no país. Entretanto, a despeito da papilomatose bovina estar distribuída em quase todos os estados da federação brasileira, não há relatos sobre os tipos virais prevalentes. Logo, pode-se verificar que o levantamento destes dados é crucial para o desenvolvimento de uma vacina eficaz.

A presente tese justifica-se pelo inegável fato de o Rio de Janeiro figurar entre os estados brasileiros com maior incidência da papilomatose, particularmente, o Norte e Noroeste Fluminense. A papilomatose em animais domésticos causa prejuízos econômicos à pecuária e, os mais relevantes referem-se à depreciação do couro, queda da produtividade leiteira, disseminação da doença pela inseminação artificial e transferência de embriões. Na presente pesquisa, foi investigada a presença do PV a partir de amostras biológicas de animais domésticos e silvestres com ou sem sinais clínicos da infecção viral. Acredita-se que esses animais atuem como modelos para novos métodos de prevenção e tratamento, e como possíveis “reservatórios naturais” do vírus na sua disseminação.

Vale ressaltar que o PV alcançou grande importância durante as últimas décadas, devido à alta prevalência mundial e ao reconhecimento do papilomavírus humano (*Human papillomavirus* – HPV) na gênese do câncer de colo uterino. Essa descoberta foi reconhecida, recentemente, pela indicação do pesquisador alemão Harald Zur Hansen, responsável pela pesquisa do HPV, ao prêmio Nobel de Medicina. Antigamente, acreditava-se que os vírus, de modo geral, não apresentavam nenhuma relação com a formação de tumores malignos. Essa hipótese foi negada, desde a década de 70, com a comprovação de que o HPV induz alterações genéticas e integra seu DNA viral ao núcleo das células hospedeiras. Em síntese, com a replicação viral, novas cópias do vírus são produzidas e, simultaneamente, o processo oncogênico se instala. No estudo de Hansen, também foi identificado que os tipos 16 e 18 do HPV são mais virulentos e induzem o câncer de colo uterino nas mulheres. Desse modo, foi possível o avanço das pesquisas com as vacinas prevenindo a infecção pelo HPV que, atualmente, acomete cerca de 500 mil mulheres por ano.

Por fim, deseja-se detectar a presença do papilomavírus nas diversas espécies animais estudadas, bem como avaliar as interações do vírus com a cromatina da célula em diferentes hospedeiros, utilizando técnicas citogenéticas e moleculares. Essa pesquisa é pioneira na análise da eventual presença do PV na espécie doméstica *Struthio camelus* e nas espécies silvestres *Panthera onca*, *Panthera leo*, *Felis concolor*, *Ara macao*, *Ara chloroptera*, *Ara ararauna*, *Sus scrofa* e *Macaca fascicularis*. Também é pioneira na análise citogenética em caninos e equinos infectados clinicamente pelo PV. Além da presença da condensação prematura de cromossomos nas culturas de linfócitos do sangue periférico e nas culturas de curta-duração das lesões de papilomas. Sempre com vistas à Sanidade Animal, a nossa estratégia de controle busca um melhor entendimento da biologia e da imunidade associada à infecção viral, além do conhecimento sobre as particularidades dessa infecção em diferentes espécies animais.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral da presente tese consiste na pesquisa do papilomavírus em espécies diversas de animais. A metodologia aplicada objetivou estudos, em nível molecular, citogenético e histopatológico, para a detecção do vírus e caracterização das alterações histológicas em diferentes animais, como forma de contribuição para o entendimento do mecanismo de replicação viral em diferentes hospedeiros e da interação do genoma viral à cromatina da célula hospedeira.

Dentre os objetivos específicos, podem-se listar:

- Detectar o DNA viral em diferentes espécimes biológicos obtidos de amostras sanguíneas e lesões epiteliais a partir de biópsias cutâneas de animais, por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR);
- Caracterizar as lesões pré-malignas e/ou malignas sugestivas da infecção viral e relacionar os aspectos anatomopatológicos com os dados clínicos e morfológicos dos animais estudados, estabelecendo um paralelismo com os achados citogenéticos e moleculares;
- Análise numérica e estrutural dos cromossomos de bovinos, equinos e caninos com sinais clínicos da infecção pelo papilomavírus, a fim de identificar possíveis aberrações cromossômicas estruturais e numéricas, a partir da cultura dos linfócitos do sangue periférico e da cultura de lesões obtidas de biópsia cutânea dos animais afetados, e analisar estatisticamente as alterações encontradas.



### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Histórico

O papilomavírus humano (*Human papillomavirus* – HPV) foi o primeiro vírus tumoral a ser transmitido experimentalmente de um hospedeiro para outro. Neste experimento, Licht (1894 apud SANTOS et al., 2002) se auto-inoculou com material da verruga cutânea do seu próprio irmão e verificou o aparecimento de uma verruga no local da inoculação. Mais tarde, Ciuffo (1907 apud SANTOS et al., 2002) foi o primeiro a demonstrar a natureza viral das verrugas humanas, por meio de filtrados livres de células, quando inoculou um extrato de verrugas em sua própria mão (HOWLEY e LOWY, 2001). A primeira infecção natural pelo papilomavírus (PV) foi descrita em 1898 (APPEL, 1987). Entretanto, só foi possível demonstrar a infecciosidade viral a partir de filtrados de suspensões de verrugas (papilomas), obtidos de bovinos, segundo Crech (1929 apud MAYR e GUERREIRO, 1988).

Apesar de haver descrições de “neoformações papilomatosas” em algumas espécies animais, desde o final do século XIX, suspeitava-se de diversos agentes externos como causa das lesões. Somente na década de 30, o primeiro PV foi descrito, quando Richard Shope (1933 apud WITTMANN, 1999, p.316) o reconheceu na cauda de coelho (*Cottontail rabbit papillomavirus* – CRPV) como o agente etiológico da papilomatose cutânea. O CRPV foi o primeiro vírus DNA oncogênico identificado.

Durante muitos anos, após esta primeira descrição por Shope, o grupo dos PVs permaneceu refratário ao estudo virológico padrão, porque não havia sistemas biológicos como culturas de células para a propagação de qualquer PV em laboratório (HOWLEY e LOWY, 2001).

Apesar da ausência de um estudo virológico padrão para PVs, aspectos clínicos e anatomopatológicos dos papilomas foram descritos em algumas espécies de animais, na maioria dos países, inclusive no Brasil (MAYR e GUERREIRO, 1988). Em equinos, em 1936, foi descrito o primeiro relato de fibropapiloma (SCHULMAN et al., 2001, p. 291). Em 1951, foi registrado o aparecimento espontâneo e experimental de papilomas no tecido cutâneo e região nasolabial de equinos

(WITTMANN, 1999, p. 260). Em caprinos, em 1954, foi feita a primeira descrição de papilomas cutâneos na região mamária (MOULTON, 1990). Em suínos, em 1961, foi descrita pela primeira vez a ocorrência de papilomas infecciosos no prepúcio (WITTMANN, 1999, p. 260). Ainda em 1961, foi realizada a identificação sorológica do PV e, em 1963, foi possível observar a estrutura viral com o desenvolvimento do microscópio eletrônico (WITTMANN, 1999, p.260). A partir de então, detalhes da infecção e ultraestrutura viral puderam ser estudados. Os papilomas escamosos filiformes foram primeiramente descritos em ovinos, por Head, (1965, apud HAYWARD et al., 1993), e associados com a infecção pelo PV (GIBBS et al., 1975 apud HAYWARD et al. 1993). A associação entre PV e tumores epiteliais expostos à luz solar que desencadearam sinais pré-malignos na orelha de uma ovelha foi descrita por Trenfield et al. (1990). Na década de 70, o fibropapiloma foi descrito na pele de bovinos (BARTHOLD et al., 1974 apud HAYWARD et al., 1993) e nas tetas de bovinos jovens (MEISCHKE, 1979 apud HAYWARD et al., 1993). Em felinos, somente em 1990, foi relatado o primeiro caso de fibropapiloma cutâneo (HANNA e DUNN, 2003).

Até a década de 70, quando o primeiro genoma do PV foi clonado com sucesso em bactérias, os pesquisadores não tinham técnicas suficientemente padronizadas para iniciar uma análise detalhada da Biologia Molecular deste grupo de vírus (HOWLEY e LOWY, 2001). A partir de então, além da padronização de técnicas, a clonagem molecular dos genomas de PVs, adequada ao material genético viral, permitiu o sequenciamento do genoma de vários PVs e teve início uma análise mutacional sistemática e uma definição dos genes deste grupo de vírus (HOWLEY e LOWY, 2001). O estudo dos PVs foi impulsionado, durante a década de 80, pelo desenvolvimento de ensaios de transformação *in vitro* que permitiram a análise das funções virais envolvidas na indução de proliferação celular. O papilomavírus bovino do tipo 1 (*Bovine papillomavirus type 1* – BPV-1), inicialmente, serviu como o protótipo para estudos de vários aspectos da Biologia Molecular dos PVs. O reconhecimento de que HPVs específicos estão estreitamente associados ao câncer de colo uterino, como também a outros tumores humanos, fez aumentar o interesse nos HPVs relacionados às lesões do trato genital (HOWLEY e LOWY, 2001).

### 3.2. Taxonomia viral

De acordo com o Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV*), o papilomavírus (PV) está classificado na família *Papillomaviridae* (antiga *Papovaviridae*). A família *Papillomaviridae* só continha, até o ano 2005, o gênero *Papillomavirus* e, atualmente, 16 novos gêneros foram incluídos: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Deltapapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus*, *Zetapapillomavirus*, *Etapapillomavirus*, *Thetapapillomavirus*, *Kappapapillomavirus*, *Lambdapapillomavirus*, *Mupapillomavirus*, *Nupapillomavirus*, *Xipapillomavirus*, *Iotapapillomavirus*, *Omikronpapillomavirus* e *Pipapillomavirus*.

Modelos de papilomavírus (PVs) com os respectivos hospedeiros naturais (humano ou animais), suas espécies e tipos virais, e sua nomenclatura abreviada, estão descritos a seguir, de acordo com o ICTV (2008) (Tabela 1). Novos PVs obtidos de lesões de animais domésticos e silvestres foram recentemente isolados, mas ainda não foram classificados pelo ICTV (Tabela 2).

Tabela 1. Aspectos taxonômicos importantes da família *Papillomaviridae* segundo referência do Comitê Internacional sobre Taxonomia Viral (ICTV, 2008).

<b>Gênero</b>	<b>Espécie/Tipo /Modelo e Abreviação</b>	<b>Hospedeiro Natural</b>
<i>Alphapapillomavirus</i>		
$\alpha$	<i>Human papillomavirus</i> (HPV-2, -3, -6, -7, -10, -11, -13, -16, -18, -26, -27, -28, -29, -30, -31, -32, -33, -34, -35, -39, -40, -42, -43, -44, -45, -51, -52, -53, -54, -55, -56, -57, -58, -59, -61, -66, -67, -68, -69, -70, -71, -72, -73, -74, -77, -78, -81, -82, -83, -84, -94, -cand62, -cand85, -cand86, -cand87, -cand89, -cand90, cand91)	Humano
	<i>Rhesus monkey papillomavirus 1</i> (RhPV-1)	Primata não-humano
	<i>Pygmy chimpanzee papillomavirus 1 chimpanzee</i> (PCPV-1C)	Primata não-humano
	<i>Pygmy chimpanzee papillomavirus 1</i> (PCPV-1)	Primata não-humano
<i>Betapapillomavirus</i>		
$\beta$	<i>Human papillomavirus</i> (HPV-5, -8, -9, -12, -14, -14D, -15, -17, -19, -20, -21, -22, -23, -31, -36, -37, -38, -47, -49, -75, -76, -80, -cand92, -cand96)	Humano
<i>Gammapapillomavirus</i>		
	<i>Human papillomavirus</i> (HPV-4, -48, -50, -60, -65, -88, -95)	Humano
<i>Deltapapillomavirus</i>		
$\delta$	<i>Deer papillomavirus</i> (DPV)	Cervo
	<i>Reindeer papillomavirus</i> (RPV)	Veado
	<i>European elk papillomavirus</i> (EEPV)	Alce europeu
	<i>Ovine papillomavirus</i> (OvPV-1, -2)	Ovino
	<i>Bovine papillomavirus</i> (BPV-1, -2)	Bovino
<i>Epsilonpapillomavirus</i>		
$\epsilon$	<i>Bovine papillomavirus 5</i> (BPV-5)	Bovino
<i>Zetapapillomavirus</i>		
$\zeta$	<i>Equine papillomavirus 1</i> (EcPV-1)	Equino
	<i>Equus caballus papillomavirus</i> (EcPV)	

<b>Gênero</b>	<b>Espécie/Tipo /Modelo e Abreviação</b>	<b>Hospedeiro Natural</b>
<i>Etapapillomavirus</i>		
η	<i>Fringilla coelebs papillomavirus</i> (FcPV)	Pássaro tentilhão
	<i>Chaffinch papillomavirus</i> (ChPV)	Pássaro Chaffinch
<i>Thetapapillomavirus</i>		
θ	<i>Psittacus erithacus timneh papillomavirus</i> (PePV)	Papagaio cinzento africano
<i>Kappapapillomavirus</i>		
κ	<i>Cottontail rabbit papillomavirus</i> (CRPV)	Coelho
	<i>Rabbit oral papillomavirus</i> (ROPV)	
<i>Lambdapapillomavirus</i>		
λ	<i>Canine oral papillomavirus</i> (COPV)	Cão doméstico
	<i>Feline papillomavirus</i> (FdPV)	Gato doméstico
	<i>Felis domesticus papillomavirus 1</i> (FdPV-1)	
<i>Mupapillomavirus</i>		
μ	<i>Human papillomavirus 1</i> (HPV-1,-63)	Humano
<i>Nupapillomavirus</i>		
ν	<i>Human papillomavirus 41</i> (HPV-41)	Humano
<i>Xipapillomavirus</i>		
ξ	<i>Bovine papillomavirus</i> (BPV-3, -4, -6)	Bovino
<i>Iotapapillomavirus</i>		
ι	<i>Mastomys natalensis papillomavirus</i> (MNPV)	Roedor <i>Mastomys natalensis</i>
<i>Omikronpapillomavirus</i>		
ο	<i>Phocoena spinipinnis papillomavirus</i> (PsPV)	Cetáceo <i>Phocoena spinipinnis</i>
<i>Pipapillomavirus</i>		
π	<i>Hamster oral papillomavirus</i> (HaOPV)	Hamster
	<i>Trichosurus vulpecula papillomavirus</i> (TvPV)	Marsupial
	<i>Possom papillomavirus</i> (PoPV)	

Tabela 2. Aspectos taxonômicos de novos papilomavírus ainda não classificados pelo ICTV (2008).

<b>Espécie/Tipo /Modelo e Abreviação</b>	<b>Hospedeiro Natural</b>	<b>Referência</b>
<i>Ursus maritimus papillomavirus type 1</i> (UmPV-1)	Urso polar	Stevens et al., 2008
<i>Trichechus manatus latirostris papillomavirus</i> (TmIPV)	Peixe-boi da Flórida	Woodruff et al., 2005
<i>Trichechus manatus latirostris papillomavirus type 1</i> (TmPV-1)		Rector et al., 2004
<i>Koala papillomavirus</i> (KoAA1)	Koala	Antonsson e Mc Millan, 2006
<i>Tursiops truncatus papillomavirus type 1</i> (TtPV-1)	Golfinho nariz-de-garrafa europeu	Rector et al., 2006
<i>Tursiops truncatus papillomavirus type 2</i> (TtPV-2)	Golfinho nariz-de-garrafa americano	Rehtanz et al., 2006
<i>Procyon lotor papillomavirus type 1</i> (PIPV-1)	Raposa	Rector et al., 2005a
<i>Capra hircus papillomavirus</i> (ChPV-1)	Cabra	Van Doorslaer et al., 2006
<i>Rousettus aegyptiacus papillomavirus type 1</i> (RaPV-1)	Morcego frutífero egípcio	Rector et al., 2006
<i>Erethizon dorsatum papillomavirus type 1</i> (EdPV-1)	Porco-espinho norte americano	Rector et al., 2005b
<i>Lynx rufus papillomavirus type 1</i> (LrPV-1)	Felino selvagem	Rector et al., 2007
<i>Panthera leo persica papillomavirus</i> (PIPV)	Leão asiático	Sundberg et al., 1996

### 3.3. Evolução filogenética do vírus

A comparação entre diferentes PVs tem mostrado que os oito genes conhecidos (E1 a E8) são homólogos. Estudos funcionais destas homologias têm servido de base para a nomenclatura, taxionomia e filogenia dos PVs (CHAN et al., 1995; CHAN et al., 1997; HOWLEY e LOWY, 2001).

A epidemiologia molecular das variantes de diversos tipos de HPV sugere que estes já existiam há 100.000 anos (CHAN et al., 1997). Na escala de evolução dos PVs, é importante analisar se a diversificação da escala evolutiva destes vírus ocorre como consequência de um hospedeiro específico e se há ou não a transmissão interespecies com papel na geração da diversidade dos tipos de PV (CHAN et al., 1997). Acredita-se que muitas espécies de animais domésticos, mamíferos selvagens e aves possam ser infectadas por um ou mais PV específico (SUNDBERG et al., 2000).

Diversas questões sobre o modo de evolução do PV não estão completamente elucidadas. No campo do entendimento da biologia viral, algumas propriedades em nível molecular de cada tipo de PV para seus respectivos hospedeiros e tecidos específicos são questões ainda obscuras. Do mesmo modo, os múltiplos tipos de PV, que se desenvolvem em mesmos tecidos e que produzem patologias similares e envolvem os mesmos hospedeiros, precisam ser analisados (CHAN et al., 1997, p.4938). Numerosas correlações entre diferentes tipos de PV na árvore filogenética e seus respectivos hospedeiros, e a diversidade destes tipos em uma única espécie de hospedeiro constituem duas teorias sobre a evolução da origem filogenética dos PVs (CHAN et al., 1997, p.4942; HOWLEY e LOWY, 2001).

No maior nível de diversidade da árvore filogenética dos PVs, identificam-se cinco supergrupos ordenados em A, B, C, D e E, nos quais se enquadram espécies com tipos virais que acometem o homem e diferentes animais domésticos e silvestres. No supergrupo A, enquadram-se, principalmente, PV humano (*Human papillomavirus* – HPV) do trato genital, PV do chimpanzé *Pigmeu* (*Pigmy chimpanzee papillomavirus* – PCPV) e PV do macaco *Rhesus* (*Rhesus monkey papillomavirus* – RhPV). O supergrupo B envolve somente as cepas do HPV que induzem alterações da doença chamada epidermodisplasia verruciforme (EV). O supergrupo C envolve os fibropapilomavírus de animais ungulados, como o PV bovino (*Bovine papillomavirus* – BPV), ovino (*Ovine papillomavirus* – OPV), do

elefante (*Elephant papillomavirus* – EPV) e do cervo (*Deer papillomavirus* – DPV). No supergrupo D, enquadram-se somente tipos de BPV (BPV-3, BPV-4 e BPV-6). No supergrupo E, encontram-se PV oral canino (*Canine oral papillomavirus* – COPV), PV felino (*Feline papillomavirus* – FdDPV), PV coelho de cauda de algodão (*Cottontail rabbit papillomavirus* – CRPV) e tipos de HPV (HPV-1, HPV-63 e HPV-41) (CHAN et al., 1995; HOWLEY e LOWY, 2001; ICTV, 2008).

Em outras espécies animais têm sido descritos PVs, tais como: PV do macaco *Colobus* (*Colobus guerezae monkey papillomavirus* – CgPV), PV de equino (*Equine papillomavirus* – EqPV), PV oral do coelho (*Rabbit oral papillomavirus* – ROPV), PV do alce europeu (*European elk papillomavirus* – EEPV), PV do passeriforme tentilhão *Chaffinch* (*Chaffinch papillomavirus* – ChPV), PV do camundongo *Multimammate* (*Multimammate mouse papillomavirus* – MmPV), PV da rena (*Reindeer papillomavirus*) e PV do roedor *Mastomys natalensis* (*Mastomys natalensis papillomavirus* – MnPV) (ICTV, 2008).

Recentemente, novos estudos têm descrito a organização genômica e a posição filogenética de novos papilomavírus: a partir de biópsias cutâneas de peixe-boi da Flórida, determinadas como *Trichechus manatus latirostris papillomavirus* - 1 (RECTOR et al., 2004, p.12698); obtidos de amostras de condiloma genital de golfinhos de vida livre da espécie nariz de garrafa, classificados como *Tursiops truncatus papillomavirus* - 2 (TtPV2); após clonagem do genoma viral, sequenciamento, caracterização gênica e análise filogenética que revelaram que o TtPV2 é muito similar ao PV do *Phocoena spinipinnis papillomavirus* 1 (PsPV1) (REHTANZ et al, 2006, p.3559); papilomavírus isolado de amostras de carcinoma basoescamosa de morcego frutífero, *Rousettus aegyptiacus* - ordem *Chiroptera* (RECTOR et al., 2006, p.273), e papilomavírus em caprinos *Capra hircus papillomavirus* (DOORSLAER et al., 2006, p.164). Utilizando *primers* múltiplos pela amplificação circular (*rolling-circle amplification* – RCA), foram determinadas a sequência de nucleotídeos, organização genômica e posição filogenética de um novo papilomavírus isolado de lesões cutâneas de porco espinho Norte Americano, caracterizado como *Erethizon dorsatum papillomavirus* type 1 (EdPV-1). Sugere-se que o EdPV-1 seja o primeiro membro do novo gênero proposto *Sigmapapillomavirus* (RECTOR et al., 2005b, p.450).

Sequências parciais de um novo papilomavírus, identificado como *Procyon lotor papillomavirus* tipo 1 (PIPV-1), foram amplificadas usando-se PCR com *primers*



degenerados específicos de papilomavírus em lesões cutâneas de raposa, espécie *Procyon lotor*. A análise filogenética classificou PIPV-1 próximo ao COPV e FdPV-1, no gênero *Lambdapapillomavirus* (RECTOR et al., 2005a, p.2031).

A papilomatose tem sido registrada em espécies variadas da Ordem *Rodentia*, tais como: hamsters, ratos de laboratório, gerbil, porquinho da índia e camundongos. Entretanto, somente três roedores da família *Muridae*, subordem *Sciurognathi*, têm apresentado infecção por PV: *Mastomys natalensis* PV (MnPV) do rato africano, *Micromys minutus* PV (MmPV) do camundongo europeu e *Hamster oral* PV (HaPV) do hamster dourado da Síria, espécie *Mesocricetus auratus* (RECTOR et al., 2005b, p.449).

Evidências sugerem que os PVs têm hospedeiros específicos ou induzem lesões verrucosas somente em hospedeiros filogeneticamente muito próximos entre si (SUNDBERG et al., 2000; HOWLEY e LOWY, 2001).

Na Figura 1, a árvore filogenética de PVs animal e humano está representada.

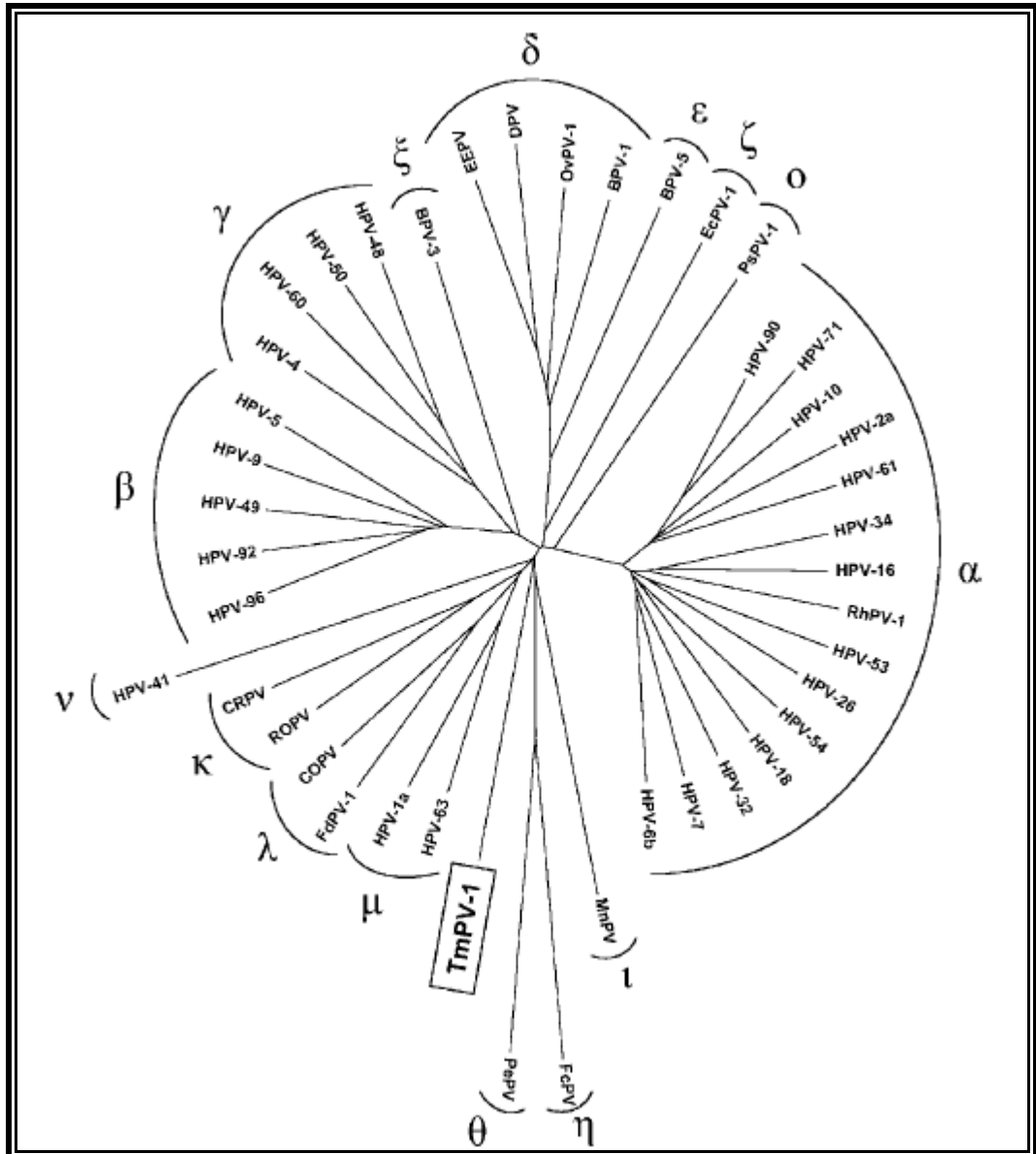


Figura 1. Árvore filogenética de papilomavírus animal e humano. A classificação baseia-se no alinhamento das sequências de nucleotídeos dos genes E1, E2, L1 e L2 do *Trichechus manatus latiostris papillomavirus type 1* (TmPV-1) com 42 outros papilomavírus (RECTOR et al., 2004).

### 3.4. Propriedades físicas, químicas e biológicas do vírus

A morfologia dos virions do PV consiste em um capsídeo esférico de simetria icosaédrica com 72 capsômeros (60 hexâmeros e 12 pentâmeros) em “arranjo torcido” (em T), não possui envelope e possui aproximadamente 55 nm de diâmetro. Quanto às propriedades físico-químicas, os virions do PV apresentam uma densidade flutuante em Cloreto de Césio (CsCl) de 1,34 g/mL. O capsídeo do PV é constituído por dois tipos de proteína estrutural, uma proteína maior denominada L1 e uma proteína menor denominada L2. A proteína L1 é a principal e gênero-específico, sua presença é correlacionada à presença do PV intacto nos tecidos e serve como medidor indireto de infecciosidade viral. Já a proteína L2 é tipo-específico (HOWLEY e LOWY, 2001; ICTV, 2008). Na Figura 2, a morfologia do virion à microscopia eletrônica está demonstrada.

O genoma do PV é constituído por uma molécula de DNA circular de fita dupla e não segmentada, com aproximadamente 8 kilobases de pares (Kbp), associada a histonas. O genoma completo contém 40 - 50% de guanina e citosina, e constitui 10 - 13% do peso do virion do PV. O genoma deste vírus contém dois segmentos principais, cada qual constituído por uma série de regiões, regiões de leitura aberta de ribossomas para o início de transcrição viral (*open reading frames* – ORFs), que codificam diferentes proteínas virais. ORFs são chamadas de precoce (E – *early*) e tardia (L – *late*). O segmento “E” representa 45% do genoma, codifica as proteínas necessárias à replicação e transcrição do DNA viral (E1 a E8) e pode induzir a transformação celular. O segmento “L” representa 40% do genoma e codifica as proteínas do capsídeo viral (L1 e L2). Entre estes dois segmentos (E e L), há um terceiro segmento que representa 15% do genoma e que tem função reguladora (*long control region* – LCR). A estrutura das principais ORFs dos PVs já foi caracterizada para BPV e HPV (HOWLEY e LOWY, 2001; ICTV, 2008).

Em relação às propriedades biológicas do PV, sabe-se que podem infectar um amplo espectro de hospedeiros na natureza. Acredita-se que Pvs infectem hospedeiros vertebrados e sabe-se que PV infecta um único tipo de hospedeiro durante seu ciclo de vida. Os hospedeiros do PV, conhecidos e hipotéticos, pertencem ao Domínio *Eucarya*, Reino *Animalia*, Filo *Chordata* e Subfilo *Vertebrata* (Classes: *Mammalia*, *Aves*, *Reptilia*). Entre os hospedeiros conhecidos do PV, estão

o homem, macaco, bovino, cão, gato, cavalo, ovelha, porco, elefante, veado, urso, golfinho, tartaruga, papagaio, animais de laboratório, entre outros (ICTV, 2008).

As propriedades físicas e químicas para a inativação e a conservação da infecciosidade do PV são amplamente conhecidas. A infecciosidade viral é conservada à temperatura de 4°C por 90 dias e a -70°C por 180 dias. O vírus permanece ativo por longo tempo, quando mantido em glicerina a 50% ou quando liofilizado. Por outro lado, o vírus é inativado a 60°C por 30 minutos e em formalina a 10%. O vírus é resistente aos solventes lipídicos, éter, grandes oscilações de pH (3,0 - 7,5) e em temperaturas até 50°C (MURPHY et al., 1999).

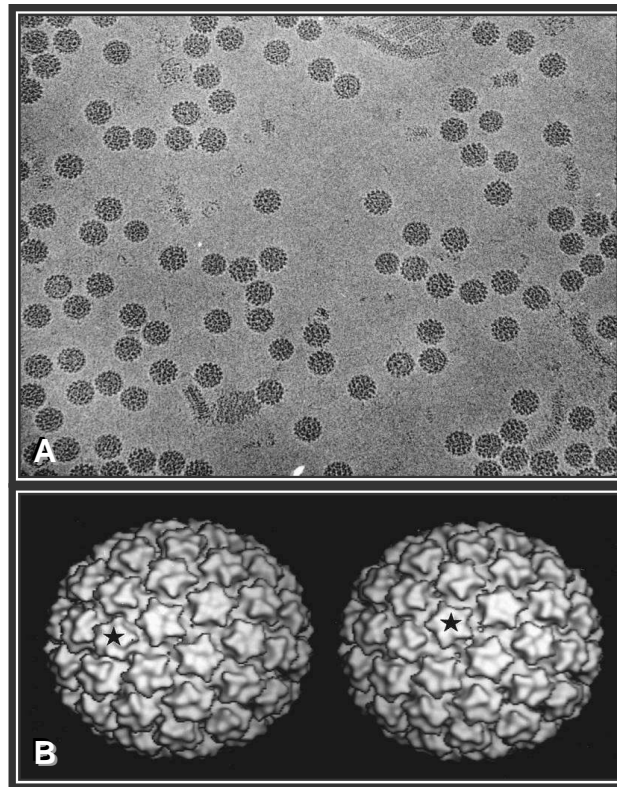


Figura 2. Morfologia do papilomavírus. A) Micrografia eletrônica de virions do *Bovine papillomavirus type 1* – BPV-1 (55 nm de diâmetro). B) Superfícies sombreadas em imagens tridimensionais de papilomavírus obtidas de uma análise microscópica crioelétrica das estruturas dos virions. Capsômeros individuais aparecem em pentâmeros (marcado com asterisco à esquerda) ou hexâmeros (marcado com asterisco à direita) (adaptado de HOWLEY e LOWY, 2001).

### 3.5. Replicação e biossíntese de macromoléculas virais

O primeiro passo na infecção viral é a adsorção do virion à célula hospedeira. Os receptores de superfície celular, para os epitopos presentes no capsídeo do PV, não estão claramente identificados. Entretanto, evidências bioquímicas sugerem a integrina  $\alpha 6$  e  $\beta 1$  ou  $\beta 4$  como possíveis receptores, como também a clatrina e o heparam sulfato (SANTOS et al., 2000; HOWLEY e LOWY, 2001).

O controle da expressão dos ORFs iniciais no PV depende do ligante celular e dos fatores de transcrição viral para a região reguladora do vírus. Acredita-se que existe um local de ligação dos fatores de transcrição, comum a todas as papilomavíruses, com diferenças individuais adicionais, já que diferentes tipos de PV não são geneticamente homogêneos (GARCÍA-VALLVÉ et al., 2006, p.1). Diferentes grupos filogenéticos compartilham um ancestral comum como, por exemplo, o gênero *Delta*, *Beta* e *Gammapapillomavirus*. No caso dos gêneros *Alpha* e *Betapapillomavirus* que infectam os mesmos hospedeiros, não necessariamente compartilham os mesmos locais dos fatores de transcrição na região reguladora do vírus (GARCÍA-VALLVÉ et al., 2006, p.3).

Sabe-se que a proteína E1 forma um complexo de replicação com proteínas celulares, progredindo a replicação do DNA bidirecionalmente da origem da replicação na região LCR do genoma. O DNA é então encapsulado por um processo de associação com proteínas histonas celulares. Uma ligação transitória com a proteína E2 guia o DNA para dentro de um agregado de proteínas L1 e L2 virais que, eventualmente, formam o capsídeo. A liberação das partículas parece ser passiva, não-citolítica, e ocorre na camada cornificada do epitélio queratinizado. A replicação de muitos PVs requer genes celulares iniciais (E1 a E8) e tardios (L1 e L2) para serem ativos em diferentes estágios do ciclo celular, de acordo com a diferenciação epitelial (CAMPO, 1997; SANTOS et al., 2000; HOWLEY e LOWY, 2001).

Há dificuldade na propagação *in vitro* para isolamento do PV (HOWLEY e LOWY, 2001). Entretanto, segundo Eisa et al. (2000, p. 49), o isolamento viral pode ser obtido a partir da implantação de extrato de verrugas de animais infectados, em cultura de células de tecido fetal bovino e em ovos embrionados de galinha. Os avanços no conhecimento das funções virais envolvidas no processo de indução da

proliferação e transformação celular foram obtidos principalmente em estudos sobre BPV-1, em cultura de células, como modelo de estudo. Genes das ORFs importantes dos vírus modelos para os eventos de transformação, replicação e biossíntese de macromoléculas do PV, principalmente do protótipo BPV-1 e mais recentemente do HPV-16, encontram-se identificados e caracterizados molecularmente (CAMPO, 1997; SANTOS et al., 2000; HOWLEY e LOWY, 2001).

A proteína codificada pela ORF E1 atua na replicação do DNA viral, permite o desenrolar do genoma viral e age como fator de alongamento na replicação do DNA. A proteína codificada pela ORF E2 envolve tanto o controle da transcrição quanto a replicação do DNA viral, responsável pelo reconhecimento e ligação da origem da replicação. Presente em duas formas: o produto do gene E2 no comprimento linear pode também reprimir a transcrição sob algumas condições e a forma N-terminal da proteína E2 que age nos repressores transcripcionais. A razão deste achado no complexo heterotrimérico com E1 regula a transcrição do genoma viral.

A proteína codificada pela ORF E4 apresenta uma expressão tardia, na qual a região C-terminal liga filamentos intermediários permitindo a liberação de partículas vírus-semelhante. Envolvida na transformação da célula hospedeira pela desregulação da mitose na célula, a E4 é encontrada abundantemente em lesões de PVs, podendo representar até 30% do total de proteínas. Em culturas de células, a E4 interage com os filamentos intermediários de citoqueratinas que, provavelmente, ajudam a replicação *in vivo* do PV.

A proteína codificada pela ORF E5 apresenta uma proteína de transformação ao interagir com receptores de fatores de crescimento, fazendo a mediação do sinal mitogênico destes fatores. Atua na obstrução dos mecanismos de supressão do crescimento: por exemplo, no receptor EGF; ativação da mitogênese com sinalização da direção via fatores transcripcionais: C-Jun e C-Fos (importante em caminhos sempre presentes na degradação do complexo p53 pela E6). Domina o controle do ciclo celular e, deste modo, participa da transformação celular.

A proteína codificada pela ORF E6 apresenta proteína de transformação celular, liga-se à proteína de supressão de tumores p53 e leva à sua degradação. E6 parece que foi substituída por E8 no subgrupo B dos BPVs. Domina o controle do ciclo celular e, deste modo, participa da transformação celular. ORF E7 apresenta proteína de transformação celular, liga-se à proteína pRb/p107. ORFs E3 e E8 não

apresentam um nível tão elevado de conservação e não estão presentes em alguns PVs.

A proteína codificada pela ORF L1 apresenta a principal e maior proteína capsídica e pode formar partículas vírus-semelhante sozinha. Atua na maturação do virion e codifica os epitopos da neutralização viral. A proteína codificada pela ORF L2 apresenta a menor proteína viral capsídica, possível proteína de empacotamento do DNA. Atua na maturação do virion.

O tipo do PV influencia a LCR, uma área do DNA de aproximadamente 500–1000 nucleotídeos, que contém a maioria ou todos os sinais regulatórios *cis*, tanto da replicação quanto da transcrição do DNA viral. Há considerável evidência de que um nível de transcrição do genoma viral, particularmente da transformação das ORFs, é importante fator na progressão para carcinoma a partir de lesões causadas pelo PV. Foi proposto que tumores podem resultar de uma falha do controle celular da transcrição viral. Por esta razão, a regulação fina da expressão gênica viral pode ser um importante passo na progressão maligna (CAMPO, 1997; HOWLEY e LOWY, 2001).

O estado físico do genoma do HPV é diferente em lesões benignas e malignas. Nas lesões benignas, está presente na forma epissomal, ou seja, não integrado ao genoma da célula hospedeira, e em múltiplas cópias. Já nas lesões malignas, o genoma do PV integra-se ao genoma da célula hospedeira e forma uma ligação estável com a perda da capacidade de replicação de maneira autônoma. O local da integração viral com os cromossomos nas lesões malignas é aleatório, porém constante em todas as células de um mesmo tumor e parece ter preferência por sítios frágeis ou próximos a oncogenes celulares. Entretanto, o sítio de abertura da molécula circular viral é específico, e ocorre entre E1 e E2. A inativação da E2 ocorre pela abertura da molécula viral, há uma superprodução dos genes E6 e E7, visto que a E2 regula a manifestação destas duas ORFs com repressão das suas transcrições. Deste modo, danos em E2 constituem o primeiro estágio na transformação.

O potencial oncogênico do vírus é relacionado aos produtos das ORFs E6 e E7, que interagem e inativam proteínas celulares derivadas dos genes supressores de tumores p53 e p105-Rb, respectivamente, além de promover a degradação destes genes com bloqueio da sua função. A E6 se liga a proteína p53, via uma proteína celular (p100), e tem como alvo sua degradação via ubiquitina. E7 liga-se a

pRb e previne a fosforilação. Isto, normalmente, resulta na apoptose, porém, tanto E6 quanto E7 interagem com proteínas celulares que influenciam no resultado da infecção (MANSUR e ANDROPHY, 1993, p.335; HOWLEY e LOWY, 2001).

Acredita-se que a degeneração da proteína p53, supressor tumoral, resulte no bloqueio das respostas celulares aos danos sofridos pelo DNA, permitindo assim o acúmulo de alterações genéticas e a criação de um genótipo maligno. O produto do gene retinoblastoma (Rb), supressor de tumores, pode causar depressão ainda maior nas defesas celulares contra o desenvolvimento de malignidade. Assim a E6 e E7 podem fornecer às células um fenótipo maligno e a oncogenicidade, portanto, vai depender diretamente do grau de afinidade entre as proteínas derivadas dos genes supressores de tumores e as proteínas virais derivadas de E6 e E7.

O resultado da integração do vírus é a “imortalização” das células. Tais células exibem morfologicamente figuras de mitoses anormais, pleomorfismo nuclear, aneuploidias e alteração da arquitetura dos cromossomos. Contudo, estas células só passam a ser tumorigênicas quando os genes transformados E6 e E7 são expostos a oncogenes celulares ativados. No entanto, o PV não atua isoladamente na oncogênese, outros fatores devem atuar em conjunto. O evento da transformação parece ser específico da célula hospedeira, assim como dependente do tipo do PV (CAMPO, 1997; STOCCO DOS SANTOS, 1998; SANTOS et al., 2000; HOWLEY e LOWY, 2001).

Atualmente, considera-se um novo tipo de PV, quando as seqüências de nucleotídeos dos genes L1, E6 e E7, aproximadamente 30% do genoma viral, diferem em mais de 10% dos tipos já descritos. Se esse percentual for menor que 2%, então o novo vírus isolado é designado como uma variante do mesmo tipo. Os subtipos virais correspondem a genomas, cuja seqüência nucleotídica, nessas regiões gênicas, diferir entre 2% e 10% dos tipos conhecidos (SOUTO et al., 2005; CLAUS et al., 2007). Na figura 3, o mapa genômico do protótipo BPV-1 está expresso com as posições dos nucleotídeos, regiões precoce (*E*) e tardia (*L*), promotores precoces (*P<sub>n</sub>*), promotor tardio (*P<sub>L</sub>*), região reguladora (*LCR*), “constitutivo propulsor transcricional” (*CE*) e os sítios precoce (*A<sub>E</sub>*) e tardio (*A<sub>L</sub>*).



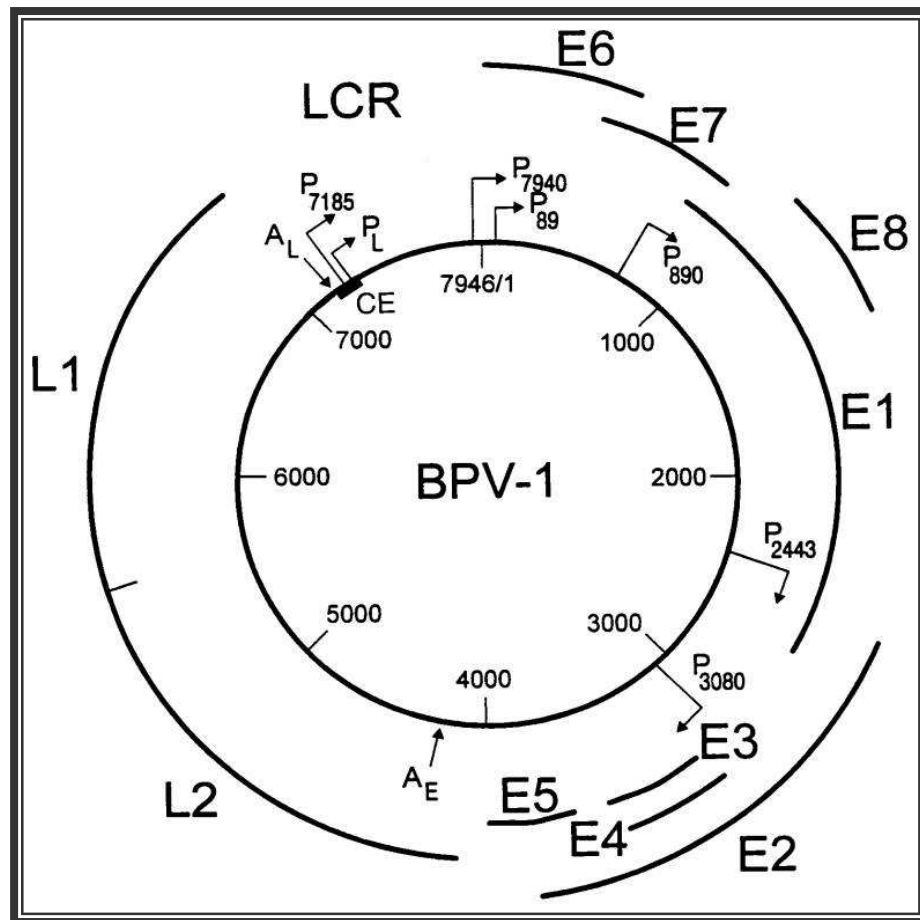


Figura 3. Mapa genômico do BPV-1 (*Bovine papillomavirus type 1*). Os números dentro do círculo indicam as posições dos nucleotídeos. As ORFs de regiões precoce (E) e tardia (L) são descritas como áreas fora do genoma circular de fita dupla. Somente uma fita é transcrita, e a transcrição ocorre na direção à direita. Os promotores precoces são indicados por uma seta marcada com  $P_n$ , onde  $n$  é a posição do nucleotídeo aproximada do sítio de iniciação do RNA.  $P_L$  é o promotor tardio, cujos sítios de iniciação mapeiam entre os nucleotídeos 7214 e 7316. A LCR contém a origem da replicação do DNA (nucleotídeos 7911 a 22) e o CE, (nucleotídeos 7162 a 7275). Os sítios precoce ( $A_E$ ) e tardio ( $A_L$ ) ficam localizados nos nucleotídeos 4203 e 7175, respectivamente (adaptado de HOWLEY e LOWY, 2001).

### 3.6. Genoma e homologia interespécies

#### 3.6.1. No papilomavírus em macaco Rhesus (*Rhesus monkey papillomavirus*)

O potencial oncogênico do RhPV-1 é sugerido em diversos animais infectados, pela presença de vários níveis de neoplasia, incluindo o câncer das células escamosas do colo uterino (OSTROW et al., 1990, p. 8170). Como resultado de pesquisas que utilizaram amostras genitais de macaco *Rhesus* e “macaco da cauda longa” (*Macaca fascicularis*), 12 amplicons distintos de RhPV foram detectados, o que corrobora a hipótese de o macaco *Rhesus* ser o hospedeiro das papilomatoses com uma diversidade similar às cepas de humanos (CHAN et al., 1997, p. 4939). Na árvore filogenética, todos os 12 diferentes amplicons de RhPVs têm sido previamente descritos como do RhPV do tipo 1. Estes novos amplicons são considerados membros do supergrupo de HPV genital e formam três ramos menores distintos dos 11 ramos formados pelos HPVs genitais (CHAN et al., 1997, p. 4940). O PV do tipo 1 de *Rhesus* (RhPV-1) é similar aos HPVs oncogênicos, tais como, HPV-16 ou HPV-18 (OSTROW et al., 1990, p. 8170). Também amostras de PVs de primatas mostraram-se intimamente relacionadas com HPVs cutâneos (HPV-1, HPV-41, HPV-63), HPVs genitais e HPV-epidermodisplasia verruciforme (CHAN et al., 1997, p. 4940).

A identificação de dois PVs do macaco *Colubus* (CgPV-1 e CgPV-2), como representantes típicos de verrugas genitais, bem como da epidermodisplasia verruciforme (EV-PVs), mostrou que eventos de ramificação da árvore filogenética dos PV podem também pressupor ramos distantes de linhagens de diferentes hospedeiros (CHAN et al., 1997, p. 4941). Ostrow et al., (1990); Chan et al., (1997) e Antonsson e Hansson (2002) pesquisaram os primatas não-humanos do “Velho Mundo”, correlacionando-os com achados da infecção pelo PV. Entretanto, há ainda poucos estudos nestas espécies.

Um novo PV amplificado foi identificado, MfPV-a, de um “macaco da cauda longa” (*Macaca fascicularis*), uma espécie pertencente ao mesmo gênero do macaco *Rhesus* (*Macaca mulatta*). O MfPV-a pode ter uma relação restrita com tipos de RhPVs (CHAN et al., 1997, p. 4941). Parece que a evolução das linhagens dos primatas, conduzida pelo gênero *Macaca* e as barreiras de transmissão pelo HPV,

resulta em uma evolução viral estritamente relacionada com o hospedeiro (CHAN et al., 1997, p. 4942).

Considerar o relacionamento entre alguns HPVs e PVs de primatas não-humanos como resultado de uma transmissão interespécies ativa homem-macaco, com referência particular ao *Pygmy chimpanzee papillomavirus* (PcPV) e ao grupo de HPV-6, HPV-11 e HPV-13, tem proposto que a transmissão interespécies entre primatas não-humanos e humanos pode ser viável (CHAN et al., 1997, p. 4942).

### **3.6.2. Nos papilomavírus dos cervos (*Deer papillomavirus*), papilomavírus dos veados (*Reindeer papillomavirus*) e papilomavírus dos alces europeus (*European elk papillomavirus*)**

Os fibropapilomavírus *Deer papillomavirus* (DPV), *European elk papillomavirus* (EEPV) e *Reindeer papillomavirus* (RPV) infectam os membros da família *Cervidae* (ERIKSSON et al., 1994, p. 8365).

Os fibropapilomavírus de cervídeos são indutores eficientes da transformação morfológica e tumorigênica em cultura de fibroblastos de roedores e podem também induzir a formação de tumor em hamsters (ERIKSSON et al., 1994, p. 8365). Nas células de camundongos C127 transformadas pelo EEPV e RPV, há um único e abundante RNAm de aproximadamente 700 nucleotídeos com capacidade de enovelar o polipeptídeo E9. Este RNAm é transcrito a partir de um promotor não reconhecido na posição 4030 no genoma EEPV (ERIKSSON et al., 1994, p. 8365).

ORF E5 é altamente conservada entre os fibropapilomavírus BPV-1, DPV, EEPV e RPV, e tem sido mostrado ser o gene de maior transformação nos genomas do EEPV, BPV-1 e DPV quando em ensaio nas células C127 (ERIKSSON et al., 1994, p. 8365). No RPV, foi identificada uma região adicional de aproximadamente 380 bp entre E5 e L2, que parece estar ausente nos genomas de BPV-1 (ERIKSSON et al., 1994, p. 8365).

Há similaridade na região inicial de extensão 3' nos genomas de EEPV e DPV em localizações equivalentes. Além disso, comparando-se as sequências desta região no EEPV, RPV e DPV, encontrou-se, nestas três espécies virais, um ORF E9,

não descoberto anteriormente, que tem o potencial de enovelar polipeptídeos hidrofóbicos de aproximadamente 40 aminoácidos (ERIKSSON et al., 1994, p. 8365).

Dez ORFs, designadas como E1 a E7 e L1 a L3, foram identificadas no genoma, todas localizadas em um único ramo (ERIKSSON et al., 1988). A presença da ORF L3 é considerada rara entre os PVs e tem sido identificada somente nos genomas do EEPV, DPV e CRPV (ERIKSSON et al., 1988). O genoma do EEPV está estritamente relacionado com o genoma do DPV, com a maioria das regiões fortemente preservadas, sendo ORFs E1 (70%), E5 (69%) e L1 (74%) (ERIKSSON et al., 1988, p. 8368).

### **3.6.3. No papilomavírus do passeriforme *Fringilla coelebs* (*Fringilla coelebs papillomavirus*)**

O primeiro papilomavírus isolado em aves foi obtido a partir de amostras de papilomas cutâneos da pata de um pássaro tentilhão por Osterhaus et al. (1977). O segundo isolamento viral originou-se de verrugas em um tentilhão na Suécia. Os dois isolamentos foram designados FPV-1 pelos holandeses e FPV-1a pelos suecos (MORENO-LOPEZ et al., 1984, p. 872).

Apesar de os tumores possuírem tamanhos limitados e, com isso, o extrato viral obtido ser em baixa quantidade, o uso das técnicas de clonagem torna possível o estudo dos PVs nas aves em nível molecular (MORENO-LOPEZ et al., 1984).

Experimentos têm registrado a clonagem molecular dos genomas de dois FPV isolados e a construção de um mapa físico. Parte da sequência homóloga foi detectada entre DNAs de um FPV isolado e do BPV-1 pela hibridização (MORENO-LOPEZ et al., 1984, p. 872).

A análise da sequência de nucleotídeos das regiões selecionadas mostrou que o FPV isolado parece ter a mesma organização genômica dos mamíferos (MORENO-LOPEZ et al., 1984, p. 872). O agente causal das lesões no *Fringilla coelebs* foi caracterizado como um PV com base no tamanho e na densidade das partículas virais, nas propriedades físicas do DNA viral e na análise das proteínas do capsídeo pela eletroforese (TERAI et al., 2002, p. 10020).

Os PVs das aves e dos mamíferos apresentam uma organização genômica similar. Estudos anteriores demonstraram similaridade do genoma do FPV com o genoma do BPV-1. Estudos de hibridização também demonstraram a relação entre os genomas de FPV e BPV-1, cujos resultados sugeriram que a sequência homóloga entre FPV e BPV-1 é inferior a 70% (MORENO-LOPEZ et al., 1984, p. 872).

O sequenciamento do genoma do FPV mostrou um grau de similaridade com HPV-1 e HPV-6 (MORENO-LOPEZ et al., 1984, p. 873). Ainda não está definida a ORF E6 de FPV, PePV e, BPV-3, BPV-4 e BPV-6, assim como ainda não está definido o papel da ORF E7 em PsPV, FPV e PePV. Em contraste, ORFs E1, E2, L1 e L2 são bem conservadas na maioria dos PVs, e seus produtos são ajustados para serem proteínas essenciais para o ciclo de vida do PV (TERAI et al., 2002, p. 10020).

O PV aviário tem um genoma de tamanho aproximado dos outros genomas do PV e, aparentemente, tem a mesma organização genética do BPV-1. ORFs E1 e L1 parecem estar localizadas em posições equivalentes nos PVs das aves e dos mamíferos e os genes iniciais e tardios estão localizados no mesmo DNA (MORENO-LOPEZ et al., 1984, p. 872).

Encontraram-se genomas com propriedades muito similares nos dois PVs isolados de pássaros, oriundos de regiões geograficamente distintas, e sugeriu-se que estes PVs pertencem ao mesmo tipo, mas podem representar subtipos diferentes (MORENO-LOPEZ et al., 1984, p. 872).

Estabeleceu-se um modelo de clivagem para as endonucleases de restrição das papilomavíroses com as enzimas *Eco* RI, *Hind* III, *Bam* HI, *Pvu* I, *Acc* I, *Pst* I, *Kpn* I, *Stu* I, *Bst* EII, *Bgl* I, *Sac* I, *Ava* I, *Sal* I, *Hpa* I, *Cla* I e *Tag* I, tanto pelos sucos quanto pelos holandeses (MORENO-LOPEZ et al., 1984, p. 872; TERA I et al., 2002, p. 10020; YUAN et al., 2007, p. 245).

Recentemente, a análise de uma parte da sequência do nucleotídeo foi usada para alinhar o genoma do EEPV com o genoma do BPV-1; diversas regiões homólogas em L1 e E1 foram claramente detectadas neste estudo, com grau de homologia da região E1, entre os genomas de FPV e BPV-1, de 55% no nível dos nucleotídeos, e menos importante no nível das sequências dos aminoácidos, ao passo que a homologia da região L1, entre os dois genomas, foi de 49% e 40% nos níveis das sequências dos nucleotídeos e dos aminoácidos, respectivamente

(MORENO-LOPEZ et al., 1984, p.873). Sequência de DNA de PV foi detectada em uma amostra de papiloma oral do papagaio cinza africano, *Psittacus erithacus timneh*, recebendo a denominação PePV, de acordo com a nomenclatura para papilomavíroses não-humanas. Uma amostra oral do papagaio, *Amazona ochrocephala*, e 24 outras amostras de papilomas cloacais de araras (*Ara sp.*), cacatuas (*Cacatua moluccensis*), periquitos (*Aratinga sp*) e papagaio (*Amazona ochrocephala*), não apresentaram DNA viral (TACHEY et al., 2002, p. 1472).

### 3.7. Epidemiologia

A papilomatose tem distribuição mundial (MILLER et al., 2003), e a maioria das infecções pelo PV é representada por infecções latentes. A virose costuma persistir em indivíduos imunossuprimidos, as lesões permanecem por até 18 meses e pode haver comprometimento severo do estado geral em função da espécie acometida (OLSON et al., 1992; GRUBER, 2002). Em grande percentual dos casos, 75 a 80%, a papilomatose tem característica autolimitante, pois apresenta regressão espontânea com o desaparecimento das lesões, mesmo sem a adoção de qualquer tratamento (MURPHY et al., 1999; MILLER et al., 2003). Após a recuperação espontânea, os animais adquirem imunidade por dois a três meses (JUBB et al., 1991; GRÜNDER, 1993). No Brasil, a papilomatose em animais domésticos, principalmente na espécie bovina, tem sido descrita em quase todos os estados brasileiros. Contudo, não há relatos suficientes e conclusivos sobre os tipos virais prevalentes no país. Portanto, a real situação epidemiológica da virose no Brasil, ainda não é conhecida (STOCCO DOS SANTOS, 2003; MARINS, 2004).

A transmissão natural dos PVs se faz principalmente por contato direto (animal/animal) ou indireto por meio de fômites contaminados (BLOOD e RADOSTITS, 1991; MURPHY et al., 1999; SANTOS et al., 2002; MILLER et al., 2003). A transmissão sexual por monta natural é possível, quando os animais apresentam verrugas genitais. Em alguns casos, os machos podem chegar ao comprometimento reprodutivo, rejeitando a monta natural (MURPHY et al., 1999). Em estudo recente, pesquisou-se a presença de sequências de DNA de BPV em amostras uterinas, ovarianas, fluidos e oócitos, oriundos de bovinos abatidos não afetados pela papilomatose cutânea e também amostras de sêmen usadas em

programas de inseminação artificial. Como resultado, encontraram-se sequências de DNA do BPV nestes tecidos do trato reprodutivo e nos gametas, mostrando que a infecção não é específica de tecidos epiteliais. Esses achados alertam para a possibilidade de transmissão do BPV por meio dos procedimentos de transferência de embriões, inseminação artificial e de fertilização *in vitro* (CARVALHO et al., 2003b, p. 83). A transmissão vertical foi sugerida como possível (STOCCO DOS SANTOS et al., 1998, p.2133; FREITAS et al., 2003b, p. 78).

A transmissão horizontal foi, experimentalmente, demonstrada para o BPV, mediante amostras de sangue bovino infectado e inoculado em animais não contaminados (STOCCO DOS SANTOS et al., 1998, p. 2133). Na forma mamária, a transmissão ocorre por equipamentos de ordenha ou mãos dos ordenhadores (“retireiros”) que carregam o PV (REBHUN, 2000). Animais que tiveram papilomas no úbere/tetas podem apresentar recidivas (CORRÊA e CORRÊA, 1992; GRÜNDER, 1993).

Barrat (1931 apud CAMPO et al. 1994) responsabilizou, embora com pequena evidência, as moscas como vetores mecânicos na transmissão da papilomatose. A possibilidade de contato com insetos (*Stomoxys calcitrans* e *Aedes aegypti*) ou a proximidade de roedores não pode ser completamente descartada (CAMPO et al., 1994, p. 155; WITTMANN, 1999, p. 318; MILLER et al., 2003, p. 101). A disseminação é maior em propriedades onde existem muitos carrapatos e situações de estresse, como transporte e desmame, os quais podem provocar ou agravar a doença (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 709).

A transmissão interespecies parece ocorrer raramente em casos de vírus DNA, que têm sido propostos como estritamente relacionados às interações moleculares entre vírus e proteínas reguladoras do hospedeiro (SHADAN e VILLAREAL, 1993 apud CHAN et al., 1997, p. 4940). Esta restrição não ocorre em todas as papilomatoses, porque alguns PVs de animais ungulados podem amplificar em seus hospedeiros heterólogos sob condições naturais e experimentais (BLOCH et al., 1994 apud CHAN et al., 1997, p. 4940).

Contudo, não há registro de nenhum tipo de HPV detectado em animais ou de algum tipo de PV animal detectado em humanos. Apesar da transmissibilidade interespecifica não ter sido sistematicamente estudada em condições experimentais, não se deve subestimar a falta de registros de casos, dada à frequência do contato dos humanos com animais domésticos e silvestres (CHAN et al., 1997, p. 4940).

Segundo estudos realizados, não há registros de que o BPV possa contaminar o homem. Entretanto, Frenz (1941 apud MAYR e GUERREIRO, 1988, p.466) admitiu ter-se contaminado com o BPV ao trabalhar com bovinos infectados pelo vírus. Em um estudo experimental, no qual o BPV foi inoculado em três pacientes humanos, somente um deles manifestou a virose, após três anos (MAYR e GUERREIRO, 1988, p. 466).

De acordo com Murphy et al. (1999), suspeitou-se da transmissão da verruga do gado para o homem, devido à alta incidência de verrugas cutâneas nos açougueiros, entretanto, o vírus isolado dessas pessoas não pareceu estar relacionado com qualquer vírus bovino conhecido. Na Grã-Bretanha, há estudos comprovados em que funcionários de abatedouros foram contaminados com o BPV (STOCCO DOS SANTOS et al., 2003). Na forma mamária, acredita-se que a papilomatose bovina possa ser transmitida pelas mãos dos “retireiros” (ordenhadores) ou por equipamentos de ordenha contaminados pelo contato com lesões durante o manuseio do úbere. Dessa forma, o BPV pode ser carregado até as áreas de abasões, caracterizando um problema de Saúde Pública (SILVA et al., 1998; STOCCO DOS SANTOS et al., 2003; MARINS, 2004). Entretanto, segundo Miller et al. (2003), a carne de um animal infectado é apropriada para o consumo humano desde que as lesões verrucosas não afetem a qualidade da carne. Apesar da má aparência, os papilomas não oferecem risco à saúde do homem e estes não contraem as verrugas de mamíferos selvagens (MILLER et al., 2003).

### **3.7.1. Epidemiologia em animais domésticos**

Em caninos, a infecção pelo PV tem sido descrita nas mais diversas raças, dentre elas, *Pug*, *Schnnauzer*, *Boxer* (NET et al., 1997, p. 12) e *Beagle* (NICHOLLS et al., 2001, p. 31). Ocasionalmente, são encontrados múltiplos casos da infecção pelo PV canino em canis, com evidência de altos índices de morbidade e acometimento principal de filhotes com média de um ano de idade. A incidência da papilomatose canina é maior em canis, devido à proximidade entre os animais com a possibilidade de disseminação mais rápida da virose. A papilomatose canina ocorre tanto em machos quanto em fêmeas, e praticamente não se verificam casos letais (MOULTON et al., 1990; NICHOLLS et al., 1999). A papilomatose canina



ainda é pouco estudada quanto à sua forma de transmissão. Entretanto, sabe-se que abrasões cutâneas podem servir como porta de entrada para o PV, assim como o contato direto com animais infectados ou fômites contaminados podem ser formas de transmissão (NICHOLLS et al., 1999, p. 365).

Em felinos, as infecções pelo PV são raramente registradas. Entretanto, estudos epidemiológicos registraram a infecção pelo PV em diferentes espécies animais da família *Felidae* com demonstração das faixas etárias e sítios anatômicos acometidos (Tabela 3) (SUNDBERG et al., 2000, p. 1). Epidemiologicamente, as raças felinas mais acometidas pela infecção pelo PV são as de pelo longo *Persa* (SUNDBERG et al., 2000, p.1) e de pelo curto *Bengala* (SCHULMAN et al., 2001, p. 291; HANNA e DUNN, 2003, p. 601).

Estudos sugerem que há no mínimo seis diferentes tipos de leopardo da neve (*Panthera uncia*), bobcat (*Felis rufus*), pantera da Flórida (*Felis concolor* ou *Puma concolor*), leopardo turvo (*Neofelis nebulosa*) e gato doméstico (*Felis domesticus*) (NET et al., 1997, p. 12). Com relação à faixa etária, a maioria dos gatos portadores de fibropapilomas possui menos de cinco anos de idade (SCHULMAN et al., 2001, p. 294). Sabe-se que a recidiva dos fibropapilomas cutâneos felinos é comum, mas casos de metástases não têm sido registrados.

Os fibropapilomas em felinos têm sido erroneamente diagnosticados como sarcoide (SCHULMAN et al., 2001, p. 291). Além disso, em face dos inúmeros casos de fibropapilomas cutâneos felinos não diagnosticados, torna-se difícil estimar a real prevalência de felinos infectados pelo PV (HANNA e DUNN, 2003, p. 602). Acredita-se na possibilidade de transmissão entre espécies, no que se refere aos registros de similaridade microscópicas das lesões papilomatosas de diferentes espécies, principalmente pela proximidade de gatos de vida livre e de bovinos (HANNA e DUNN, 2003, p. 602).

Tabela 3. Achados epidemiológicos de lesões em felídeos positivos para infecção pelo papilomavírus

<b>Nome Comum</b>	<b>Nome Científico</b>	<b>Idade em Meses</b>	<b>Sítio Anatômico</b>	<b>Abreviação do PV</b>
Gato doméstico	<i>Felis domesticus</i>	7 - 180	Pele	FdPV-1
Gato doméstico	<i>Felis domesticus</i>	6 - 108	Língua	FdPV-2
Pantera da Flórida	<i>Felis concolor</i>	Adulto	Língua	FcPV
Bobcat	<i>Felis rufus</i>	Adulto	Língua	FvPV
Leão Asiático	<i>Panthera leo</i>	Adulto	Língua	PIPV
Leopardo da neve	<i>Panthera uncia</i>	5 - 192	Cavidade oral	PuPV-1
Leopardo da neve	<i>Panthera uncia</i>	72	Pele	PuPV-2
Leopardo turvo	<i>Neofelis nebulosa</i>	Adulto	Língua	NnPV

(Adaptado de SUNDBERG et al., 2000)

Em ovinos, em um estudo realizado no Sul do País de Gales, 2.660 animais, entre ovelhas e cordeiros, foram examinados (HAYWARD et al., 1993). Neste estudo, observou-se que o papiloma escamoso filiforme ocorria em menos de 1% das ovelhas jovens e concluiu-se que tanto a infecção natural quanto à infecção experimental pelo PV, em ovelhas, foram de curta duração (HAYWARD et al., 1993). Entretanto, o período de regressão e a imunidade, associados com a papilomatose cutânea em ovinos, ainda não estão elucidados, nem quanto ao sexo, faixa etária e prevalência das raças acometidas (MOULTON, 1990). Sobre a transmissão em ovinos, há um único relato, na Inglaterra, da transmissão de múltiplos papilomas cutâneos de um ovino para outro da mesma raça (YAGER e SCOTT, 1991). A partir desse relato, sugere-se que as áreas lesionadas da pele podem servir como fonte de infecção, ou a transmissão pode ocorrer por meio de vetores mecânicos, como os artrópodes, com a penetração do PV na pele (HAYWARD et al., 1993).

Em caprinos, a maioria das lesões papilomatosas regride completamente, outras regridem e recidivam, e ocasionalmente, algumas progridem para um estágio mais avançado, de carcinomas (BLOOD e RADOSTITS, 1991). Com relação ao sexo, a literatura relata que as fêmeas são afetadas com maior frequência quando comparadas aos machos, e não há dados a respeito da faixa etária mais atingida, porém, sabe-se que a enfermidade comumente acomete os caprinos adultos

(MOULTON, 1990). Sugere-se uma transmissão, por contato direto, animal-animal, principalmente quando há abrasões cutâneas como porta de entrada para o PV. Outra forma de transmissão pode ocorrer pelo contato indireto, por meio do uso de utensílios contaminados no ato da ordenha. Contudo, os modos de transmissão não estão confirmados. Amostra de *swab* da pele íntegra de um caprino fêmea de sete anos de idade foi analisada recentemente na pesquisa do papilomavírus em animais artiodáctilos. A caracterização genética do PV em caprinos *Capra hircus papillomavirus type 1* (ChPV-1) foi comprovada pelas técnicas de clonagem e sequenciamento do genoma completo, contendo 7542bp, e sugere-se a classificação filogenética no gênero *Xipapapillomavirus*, presente até o momento, apenas os BPV-3, -4 e -6 (VAN DOORSLAER et al., 2006).

Em suínos, as neoplasias são raras. Quando ocorrem, os linfossarcomas e os nefroblastomas correspondem a aproximadamente 40% dos diagnósticos tumorais. A papilomatose suína é raramente observada em suínos e é considerada uma doença transmissível autolimitante (VITOVEC et al., 1999; SOBESTIANSKY et al., 1999). Quando a doença se instala, os primeiros sintomas ocorrem por volta de oito semanas após a infecção e, geralmente, as lesões regredem espontaneamente e o animal torna-se imune a novas infecções pelo PV (WITTMANN, 1999, p. 260). Sobestiansky et al. (1999) acreditam que a baixa ocorrência de neoplasias em suínos deve-se ao abate precoce de animais, com idade inferior a seis meses, além do descarte de matrizes e reprodutores, antes que atinjam a senilidade. No Brasil, os únicos registros de papilomatose suína foram feitos em 1995, no estado do Rio Grande do Sul, quando foram encontrados papilomas em um leitão recém-nascido e em uma matriz de terceira gestação (SOBESTIANSKY et al., 1999). A transmissão de papilomas às fêmeas ocorre quando existem escoriações na vulva e na mucosa vaginal, durante a cópula ou coito (WITTMANN, 1999, p. 260).

Em bovinos, o aparecimento da papilomatose foi confirmado por meio de diversos trabalhos e é considerada uma virose de distribuição mundial (numerosos países da América, Europa e Ásia) (WITTMANN, 1999, p. 317; EISA et al., 2000, p. 48; MILLER et al., 2003, p. 101). A prevalência da virose é maior nos bovinos quando comparada a das outras espécies domésticas. Bovinos de todas as idades são atingidos, mas a incidência é maior em bezerros, com menos de dois anos (MURPHY et al., 1999; EISA et al., 2000, p.48). Rosenberger (1941 apud WITTMANN, 1999, p. 317) assinalou a presença da papilomatose em 2,5% de todos

os bovinos observados pelo próprio pesquisador. Olson (1962 apud WITTMANN, 1999, p. 317) indicou um grau de apresentação de 23% em 1000 bovinos de corte, entre 10 e 21 meses de idade. Aliverdiev et al. (1966, apud WITTMANN, 1999, p. 317) comprovaram que 61% dos animais de uma criação de bovinos jovens sofriam da virose.

A morbidade na papilomatose bovina é muito variável, existindo propriedades onde ocorrem raros casos e outras em que 20% ou mais dos animais apresentam a doença. Já a letalidade é sempre baixa e, quando ocorre, é devido ao enfraquecimento do animal, seja pela presença de grande número de papilomas ou pela ocorrência de miíases, que aparecem quando os papilomas são extirpados por traumatismo, o que debilita ainda mais o animal. A papilomatose bovina possui, em cerca de 85% dos casos, característica autolimitante, já que apresenta regressão espontânea das lesões, mesmo sem qualquer tipo de tratamento. Uma vez que a infecção tenha completado seu ciclo viral, os papilomas sofrem um processo de necrose e conseqüentemente se desprendem. Acredita-se que essa regressão espontânea esteja associada à resposta imunocelular do hospedeiro (TSIRIMONAKI et al., 2003; MARINS, 2004). Após a recuperação, os animais adquirem imunidade por dois a três meses (SILVA et al., 1998). A possibilidade de ocorrência de reinfecção não pode ser descartada e, possivelmente, pode estar associada à perda da imunidade ou a um novo contágio por tipos distintos do BPV (WITTMANN, 1999, p.318).

Experimentalmente, inocularam-se amostras infectadas de sangue bovino em animais contaminados e detectaram-se sequências de DNA do BPV, provando ser possível a transmissão horizontal (STOCCO DOS SANTOS et al., 1998, p.2133; CARVALHO et al., 2003, p.83). Dessa forma, comprova-se a transmissão pelo contato indireto, por cercas, troncos (EISA et al., 2000, p.53), utensílios contaminados utilizados na marcação, castração, palpação retal e vacinação (SILVA et al., 1998), e uso de agulhas hipodérmicas contaminadas (STURION et al., 1997). Ressalta-se que a transmissão pode ocorrer por contato direto com animais infectados e os bovinos “portadores sãos”, principal fonte de infecção do BPV (MAYR e GUERREIRO, 1988, p. 468; STURION et al., 1997; SILVA et al., 1998; EISA et al., 2000, p. 48; HEMMATZADEH et al., 2003). No caso específico da papilomatose genital com presença de papilomas no pênis, vulva e vagina, a transmissão ocorre principalmente por meio da monta natural (SILVA et al., 1998).

Entretanto, a infecção pelo BPV pode ocorrer, embora de forma mais rara, em animais inseminados artificialmente (MURPHY et al., 1999). Contudo, Carvalho et al. (2003, p. 83) chegaram à conclusão de que a transmissão do BPV não se limita ao contato direto de animal para animal, indireto por objetos contaminados e em animais inseminados artificialmente, pois, além de amostras de sêmen, o BPV foi detectado no colostro, urina, placenta, líquido amniótico e sangue.

Logo, é possível a transmissão por inseminação artificial (IA), transferência de embriões, fertilização *in vitro* e até mesmo a transmissão vertical da vaca para o feto (CARVALHO et al., 2003, p. 84; FREITAS et al., 2003, p. 76). Sequências de DNA de BPV também foram detectadas em amostras uterinas, ovarianas, fluídos e oócitos de vacas abatidas que não apresentavam sinais clínicos da papilomatose cutânea (CARVALHO et al., 2003, p. 84). Há ainda evidências que sugerem moscas, mosquitos e carrapatos como possíveis vetores mecânicos na transmissão da doença. Além disso, a possibilidade de contágio por contato com roedores infectados não pode ser completamente descartada (CAMPO et al., 1994, p.155).

Em equinos, a papilomatose quando comparada à bovina e canina, é relativamente rara (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 709). Esta enfermidade representa aproximadamente 5% de todos os tumores equinos submetidos a exame histológico. Portanto, ocasionalmente, ocorre em cavalos e, provavelmente, esta estimativa é baixa em virtude da natureza inofensiva do tumor e da confiabilidade do diagnóstico clínico (YAGER e SCOTT, 1991, p. 531). A baixa morbidade é comum e praticamente não há letalidade na papilomatose equina (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 710).

Entretanto, a papilomatose pode tornar-se um problema no haras, especialmente quando se mantêm equinos jovens em regime de confinamento (MERCK, 2001). Em geral, os papilomas equinos aparecem de forma esporádica, embora haja um relato em grupo relativamente pequeno de animais. Neste relato, quatro animais de uma mesma família manifestaram sinais clínicos da infecção pelo PV equino, dentro de um período de apenas seis semanas (BLOOD e RADOSTITS, 1991). A ocorrência da papilomatose equina é mais frequente em animais jovens, com menos de dois anos de idade, porém, potros recém-nascidos também são acometidos (BLOOD e RADOSTITS, 1991; EVANS, 1994; WHITE et al., 2004).

Além disso, esta enfermidade pode ocorrer em equinos idosos, com mais de 18 anos, principalmente aqueles imunologicamente isentos de contato anterior com

o PV (KNOTTENBELT e PASCOE, 1998). Alguns autores apontam os cavalos “Puro Sangue Inglês” (PSI) como os da raça mais afetada pela papilomatose cutânea, embora esta possa ocorrer em equinos de muitas outras raças (WHITE et al., 2004). Geralmente, ocorre regressão espontânea das lesões papilomatosas, dentro de três a 12 meses (BLOOD e RADOSTITS, 1991; YAGER e SCOTT, 1991; EVANS, 1994; KNOTTENBELT e PASCOE, 1998; WHITE et al., 2004). Após a recuperação, os equinos tornam-se imunes a reinfecção pela mesma cepa ou tipo viral (WITTMANN, 1999, p.261).

A papilomatose equina pode ocorrer na forma adquirida ou congênita. Os papilomas equinos congênitos são menos comuns do que os adquiridos (WHITE et al., 2004). A transmissão pela forma adquirida da papilomatose equina ocorre pelo simples contato (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 709), por meio de abrasões cutâneas pelo corpo (MERCK, 2001) ou pela injeção intradérmica de suspensão de tecidos de papilomas (BLOOD e RADOSTITS, 1991). Os principais reservatórios do PV equino são os próprios animais doentes, fato corroborado pelo curso clínico bastante prolongado (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 710). A forma congênita da papilomatose equina já foi registrada, porém, de rara ocorrência. Alguns autores se baseiam na hipótese da transmissão do PV pela via transplacentária e, assim, justifica-se a forma congênita de transmissão (BLOOD e RADOSTITS, 1991, p. 790).

### 3.7.2. Epidemiologia em animais silvestres

São escassos os estudos epidemiológicos sobre a papilomatose em animais silvestres. Atualmente, as pesquisas buscam a caracterização genômica de variadas espécies silvestres e exóticas, como em animais australianos (ANTONSSON e Mc MILLAN 2006), golfinho americano (*Tursiops truncatus*) (REHTANZ et al., 2006), leões asiáticos (*Panthera leo persica*) (SUNDBERG et al., 1996), morcego egípcio (*Rousettus aegyptiacus*) (RECTOR et al., 2006), peixe-boi (*Trichechus manatus latirostris*) (RECTOR et al., 2004; WOODRUFF et al., 2005), porco-espinho (*Erethizon dorsatum*) (RECTOR et al., 2005), raposa (*Procyon lotor*) (RECTOR et al., 2005), urso polar (*Ursus maritimus*) (STEVENS, et al., 2008), entre outros.

Entretanto, diferentes espécies de PV têm sido identificadas nestes animais e encontram-se disponíveis no banco de dados (*GenBank*) do Centro Nacional de

Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information* – NCBI). Algumas destas espécies de PV em animais silvestres já estão classificadas entre os diferentes gêneros da família *Papillomaviridae* e entre os cinco supergrupos (A-E) do maior nível de diversidade da árvore filogenética dos PVs. Outras destas espécies de PV, em animais silvestres, ainda não estão devidamente classificadas, mas já estão consideradas para a classificação oficial pelo ICTV (ICTV, 2008).

Entre as espécies de PV de animais silvestres, atualmente, encontram-se: Espécies de PV do supergrupo A que causam papilomatose em primatas, a espécie classificada no gênero *Alphapapillomavirus* que acomete o macaco *Rhesus* (*Rhesus monkey papillomavirus* – RhPV) e também as espécies ainda não classificadas em gênero que acometem o macaco Colobus (*Colobus monkey papillomavirus* – CgPV) e o chimpanzé Pigmeu (*Pigmy chimpanzee papillomavirus* – PCPV). Espécies de PV do supergrupo C que causam fibropapilomatose em ungulados, as espécies classificadas no gênero *Deltapapillomavirus* que acometem o cervo (*Deer papillomavirus* – DPV) e o alce europeu (*European elk papillomavirus* – EEPV), e também a espécie ainda não classificada em gênero que acomete o elefante (*Elephant papillomavirus* – EPV).

Espécies de PV que causam papilomatose cutânea em aves (passeriformes e psitacídeos), a espécie classificada no gênero *Etapapillomavirus* que acomete o pássaro tentilhão (*Fringilla coelebs papillomavirus* – FcPV) e a espécie classificada no gênero *Thetapapillomavirus* que acomete o papagaio cinzento de Timneh (*Psittacus erithacus timneh papillomavirus* – PePV), e também a espécie ainda não classificada em gênero que acomete o pássaro tentilhão-comum (*Chaffinch papillomavirus* – ChPV). Espécie de PV que causa papilomatose cutânea em roedores e ceratoacantomas no seu hospedeiro natural, a espécie classificada no gênero *Iotapapillomavirus* que acomete o roedor *Mastomys natalensis* (*Mastomys natalensis papillomavirus* – MNPV), e também a espécie ainda não classificada em gênero que acomete o camundongo *Multimammate* (*Multimammate mouse papillomavirus* – MmPV).

Espécies de PV do supergrupo E que causam papilomatose mucosa e cutânea em lagomorfos, as espécies classificadas no gênero *Kappapapillomavirus* que acometem o coelho (*Cottontail rabbit papillomavirus* – CRPV e *Rabbit oral papillomavirus* – ROPV). Espécie de PV que causa papilomatose mucosa genital em cetáceos, a espécie classificada no gênero *Omikronpapillomavirus* que acomete o

cetáceo *Phocoena spinipinnis* (*Phocoena spinipinnis papillomavirus* – PsPV). Espécie de PV que causa papilomatose mucosa em hamsters, a espécie classificada no gênero *Pipapillomavirus* que acomete o hamster (*Hamster oral papillomavirus* – HaOPV).

Além destas espécies de PV, nestes animais, recentes estudos têm revelado a presença de lesões indicativas de papilomatose em outros animais silvestres, possivelmente causadas por novas espécies de PV sujeitas à nomenclatura e ainda não classificadas pelo ICTV. Estes estudos têm envolvido lesões fortemente indicativas de papilomatose em espécies de animais silvestres, como papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*), tartaruga de couro (*Caretta caretta*), tartaruga verde marinha (*Chelonia mydas*) (MATUSHIMA et al., 2001), iguana verde (*Iguana iguana*), golfinho (*Phocoena spinipinnis*) e peixe-boi (*Trichechus manatus latirostris*), entre outras (CHAN et al., 1995; HOWLEY e LOWY, 2001; ICTV, 2008).

De acordo com um recente estudo realizado por Schulman et al., (2003, p.103), a associação de PVs, entre animais domésticos e silvestres, tem sido documentada por meio de estudos sobre fibropapilomas em bovinos, equídeos, ovinos, camelídeos, cervídeos, antílopes e, mais recentemente, em felinos. Neste estudo, em camelídeos (lhamas e alpacas), foram diagnosticados cinco fibropapilomas mucocutâneos com achados histológicos similares aos do sarcoide equino. A análise molecular destes fibropapilomas provou que todos os cinco tumores foram positivos para DNA de PV.

A análise das sequências dos nucleotídeos do produto do PCR, a partir de um fibropapiloma de lhamas, confirmou a presença de um único PV. Mediante a análise das sequências dos nucleotídeos do PV dos camelídeos, constataram-se 73% de homologia com o BPV-1 e 64% de homologia com o COPV. Quanto à localização destes fibropapilomas, observou-se que estavam localizados na região da cabeça, focinho, lábios e bochechas dos camelídeos. Quanto à faixa etária acometida, constatou-se que todos os camelídeos apresentavam seis anos de idade. Quanto ao sexo, quatro dos camelídeos eram fêmeas, e apenas um era macho e castrado. Concluiu-se que os fibropapilomas podem reincidir, progredir e ocasionalmente regredir espontaneamente e são geralmente observados em animais jovens (SCHULMAN et al., 2003, p. 103).

Na Tabela 4, estão demonstrados achados epidemiológicos dos fibropapilomas mucocutâneos nos camelídeos. Em biópsias dos camelídeos (lhamas



e alpaca), frequentemente foram observadas proliferações fibroblásticas benignas sésseis com hiperplasia epitelial, hiperqueratose e com longos sulcos papiliformes, com predominância de proliferação fibrosa e epitelial. Histologicamente, os tumores cutâneos dos camelídeos foram caracterizados por núcleo fusiforme, fina camada de cromatina, pequeno nucléolo, citoplasma eosinofílico, moderado hiperqueratose ortoqueratótica e branda anisocariólise (SCHULMAN et al., 2003, p. 104).

Tabela 4. Achados epidemiológicos de fibropapilomas mucocutâneos em camelídeos.

<b>Camelídeo</b>	<b>Idade em Anos</b>	<b>Sexo</b>	<b>Sítio Anatômico</b>	<b>Recidiva</b>
Llama	6	Fêmea	Lábios e focinho	Recidiva e progressão
Llama	6	Fêmea	Focinho	Sem recidiva em 2 anos
Alpaca	6	Fêmea	Lábios e bochechas	Sem recidiva em 9 meses
Alpaca	6	Fêmea	Lábios e bochechas	Sem recidiva em 9 meses
Alpaca	6	Macho	Lábios	Sem recidiva em 6 meses

(Adaptado de SCHULMAN et al., 2003)

Em um distinto estudo desenvolvido em elefantídeos por Jacobson et al., (1986), lesões cutâneas proliferativas foram diagnosticadas em 33 elefantes africanos importados do Texas (Estados Unidos) e em 63 elefantes jovens do Zimbabwe (África). Neste estudo, sete dos 33 elefantes importados apresentaram crescimento fibroso nodular em elevação, localizado predominantemente na tromba. Ao passo que as lesões dos 63 elefantes jovens começaram com um crescimento proliferativo focal pequeno, dos quais alguns regrediram e outros progrediram para um crescimento nodular fibroso expansivo.

Amostras das lesões, em vários estágios de desenvolvimento, foram colhidas e preparadas para histopatologia. As lesões jovens eram papilomas invertidos, com hiperplasia e células epiteliais hipertróficas, contendo inclusões intranucleares. Crescimentos fibrosos tardios, grandes e nodulares, eram ulcerados e compostos, predominantemente, por fina camada dérmica contendo fibroblastos, colágeno e um infiltrado de células inflamatórias, sem inclusões nas células

adjacentes (JACOBSON et al., 1986). À imunistoquímica, não foram detectados antígenos grupo-específico de PVs. A análise do DNA pela hibridização *Southern blot* não indicou genoma específico de PV nos espécimes clínicos. À microscopia eletrônica, foram detectadas inclusões com partículas virais eletrodensas, agregadas e com a conformação do PV, associadas às partículas de herpesvírus (JACOBSON et al., 1986).

### **3.8. Correlação entre os tipos e diferentes hospedeiros do papilomavírus**

Mais de 200 tipos de PV têm sido descritos nos humanos, enquanto somente 20 tipos têm sido confirmados nos animais. Em algumas espécies de hospedeiros, múltiplos tipos de PV têm sido encontrados, e os dados disponíveis sugerem alguma correlação entre cada tipo de PV, patologia e tecido-alvo (tecido epitelial, epitélio estratificado da mucosa e células mesenquimais da derme) (CHAN et al., 1997).

Ao correlacionar o PV canino, COPV, com outras espécies pela análise da sequência do nucleotídeo evidencia-se que cerca de 64% correspondem à similaridade para a região L1 do HPV e 57% para o COPV, indicando que o PV cutâneo canino, obtido a partir de lesões dos nervos epidermais pigmentados, é geneticamente mais próximo do HPV do que COPV (TANABE et al., 2000). Por meio de amostras de tumores caninos amplificadas pela análise de PCR, foi possível identificar um tipo de PV canino que apresentou 79% de similaridade com o HPV-69, uma cepa viral humana considerada de alto risco de malignidade para o câncer de colo uterino nas mulheres (SOUZA et al., 2003). Achados histológicos, citológicos e ultraestruturais da infecção cutânea causada no cão da raça *Boxer* evidenciam similaridade com resultados encontrados no HPV-4, HPV-60 e HPV-65 (NET et al., 1997, p.13). Pesquisou-se que as proteínas L1 e L2 do HPV-16, quando usadas para mapear locais antigênicos e imunogênicos, induzem uma reação cruzada entre HPV, BPV, CPV e APV (DILLNER et al., 1991).

Em amostras de PV felino, foi possível observar microscopicamente uma grande inclusão intracitoplasmática de HPV-1, PV causador de verruga plantar nos humanos (SUNDBERG et al., 2000, p. 7). O PV felino induz lesões imunossupressoras nos gatos domésticos similares àquelas encontradas nos

indivíduos com traço autossômico recessivo de epidermodisplasia verruciforme (EV) (SUNDBERG et al., 2000, p. 7).

Pesquisadores do HPV têm associado à papilomatose em humanos a placas cutâneas na pele de gatos domésticos, comumente diagnosticados como portadores da doença de Bowen (SUNDBERG et al., 2000, p. 8). A doença de Bowen, até recentemente conhecida como “papilose” ou “papilomatose de Bowenoid”, tem sido diagnosticada como casos de carcinoma das células escamosas *in situ* multicêntrico, predominantemente na região anogenital dos humanos (SUNDBERG et al., 2000, p. 8). São encontradas grandes inclusões intracitoplasmáticas na infecção pelo CfPV-2, causador de verrugas cutâneas invertidas, e no PV do gato doméstico (FdPV-1, responsável por lesões cutâneas, e FdPV-2, responsável por lesões de mucosa) (SUNDBERG et al., 2000, p. 7). Nas inclusões intracitoplasmáticas do cão (*Canis domesticus*), do gato doméstico (*Felis domesticus*) e do leão asiático (*Panthera leo*), observaram-se aberrações ultraestruturais intermediárias no filamento da montagem viral induzidas pelo PV (SUNDBERG et al., 2000, p. 7).

Pela análise da sequência de nucleotídeos do gene L1, foi possível demonstrar que o genoma do FdPV está estritamente relacionado com o do COPV, apresentando 86% de similaridade (MASANORI et al., 2002). Em relatos recentes sobre o fibropapiloma cutâneo felino, pôde-se constatar que o gene E1 isolado do PV apresentou 75% de homologia com o BPV-1 (SCHULMAN et al., 2003, p. 105), o que comprovou a associação do fibropapiloma cutâneo felino com o BPV (HANNA e DUNN, 2003). Histologicamente, os fibropapilomas cutâneos felinos são similares àqueles observados nos fibropapilomas bovinos. Por outro lado, o fibropapiloma felino e o sarcoide equino são considerados praticamente idênticos e caracterizados pela proliferação de fibroblastos com hiperplasia epitelial (SCHULMAN et al., 2001, p. 291).

Os papilomas escamosos filiformes dos ovinos correspondem estritamente às lesões papilomatosas escamosas dos bovinos (HAYWARD et al., 1993). Portanto, discute-se a possibilidade de o OPV ser um subtipo do BPV-2. O experimento desenvolvido por Trenfield et al. em 1990, quando trataram uma lesão cutânea na orelha de um ovino com endonucleases de restrição, utilizando o mesmo padrão das 12 enzimas existentes para o DNA do BPV, fomenta esta discussão. Foram utilizadas oito enzimas idênticas às 12 para o BPV-2, e duas iguais às 12 enzimas

para o BPV-1 e concluiu-se que o OPV apresentou relação mais estreita com o BPV-2 do que com o BPV-1.

A etiologia do BPV como causa do sarcoide equino foi primeiramente registrada em 1951. Desde então, numerosos estudos têm provado a evidência de que o BPV está relacionado com o desenvolvimento do sarcoide equino, principalmente BPV-1 e BPV-2 (SCHULMAN et al., 2001, p. 7; NASIR et al., 2007, p. 290). Boley (1940 apud STURION et al., 1997, p. 51) afirma que o vírus da papilomatose bovina é altamente específico. Entretanto, Cook e Olson (1951 apud STURION et al. 1997, p. 51), e Segret et al. (1955 apud STURION et al., 1997, p. 51) reproduziram a doença em equinos e verificaram que equinos com verrugas causadas pelo BPV possuem anticorpos neutralizantes em seu soro, enquanto bovinos com papilomatose não os possuem. Verificaram também que uma amostra do BPV com baixa virulência para bovinos apresentou baixo poder infeccioso para equinos (STURION et al., 1997, p. 51).

O sarcoide equino é o tumor de pele mais comum nos cavalos, sendo o PV seu agente causal mais provável, pois lesões similares a esta neoplasia foram produzidas experimentalmente com inoculações de BPV em cavalos (STURION et al., 1997; MURPHY et al., 1999). Foz Filho et al. (2002) evidenciaram que o próprio PV equino é o causador do sarcoide nesta espécie. Entretanto, sequências de DNA homólogas às do BPV-1 e BPV-2 foram encontradas em tumores sarcoides, por meio de métodos diagnósticos moleculares (BLOOD e RADOSTITS, 1991; MURPHY et al., 1999). Bloch et al. (1994) confirmaram a presença de apenas um tipo viral (BPV-1 ou BPV-2) em diferentes lesões de um mesmo equino. Tumores histologicamente similares ao sarcoide equino são vistos também em felinos. Relata-se a presença de sequências de nucleotídeos homólogas às do BPV-1 e BPV-2 nestas lesões em felinos (TEIFKE et al., 2003).

Recentemente, têm sido pesquisadas sequências da região reguladora transcricional (*transcriptional regulatory unit* ou *Long Control Region* – LCR, também denominada *Upstream Regulatory Region* – URR), e ativadores transcricionais do gene E2 do BPV-1 em linhagens celulares de fibroblastos de bovinos e equinos, para a identificação e análise funcional de variantes gênicas no sarcoide equino (NASIR et al., 2007, p. 359).

### 3.9. Técnicas de análise citogenética

Antigamente, para a análise de cromossomos, o estudo citogenético dependia de as células dividirem-se espontaneamente, tais como as células da medula óssea e do tecido testicular, e utilizavam-se técnicas primitivas de fixação e distribuição dos cromossomos. Mais tarde, inovações técnicas como o desenvolvimento de cultura de tecidos *in vitro*, o uso de solução hipotônica para expandir as células e facilitar o espalhamento dos cromossomos, uso da colchicina para interromper a divisão celular na metáfase, e a descoberta de fatores mitogênicos linfocitários, como a fitohemaglutinina, permitiram a citogenética tornar-se viável como ciência clínica. Com o avanço das técnicas, a citogenética tem assumido um importante papel no diagnóstico de doenças herdadas geneticamente e doenças adquiridas, e é atualmente usada como ferramenta na pesquisa da genética básica (BARCH, et al., 1991).

Em 1960, Nowell observou que a fitohemaglutinina, um extrato obtido a partir de feijões vermelhos que tinham sido usados com propriedades de aglutinação de sangue, era um estimulante mitótico. No mesmo ano, Moorhead, Nowell e outros pesquisadores combinaram a técnica de cultura do sangue periférico e o método de secagem ao ar das lâminas. Esta técnica é utilizada ainda hoje com algumas modificações (BARCH, et al., 1991).

Os leucócitos mononucleares, chamados linfócitos, são as células usadas para rotina do estudo citogenético. No sangue periférico circulante, cerca de 35% das células brancas do sangue são linfócitos. A maioria delas são linfócitos pequenos, que constituem 55 a 75% de células T (células dependente do timus, responsáveis pela imunidade celular) e aproximadamente 15 a 30% são constituídas de linfócitos B (células dependentes da bursa, responsáveis pela imunidade humoral ou produção de anticorpos). Os linfócitos T e B não são distinguidos pela citogenética, mas apresentam diferenças em resposta ao agente mitogênico, por exemplo: a população de células T é afetada principalmente pelas substâncias fitohemaglutinina e concanavalina A, e a população de linfócitos B é afetada principalmente pela ação de vírus como *Epstein-Barr virus* (EBV) (MICHALOWSKI, 1963 apud BARCH et al., 1991, p. 18).

O mitógeno mais comumente usado nos estudos citogenéticos é a fitohemaglutinina. Os efeitos dessa substância são pré-mitóticos; nas primeiras

24 horas, existe um aumento considerável na síntese de RNA, os linfócitos produzem interleucina-2 (IL-2), ou fatores de crescimento estimulam a mitose. Durante as primeiras 30 horas de cultura, a síntese de DNA é baixa, mas aumenta entre 30 a 60 horas de cultura. O pico da atividade mitótica é alcançado após 60 a 70 horas de cultura e é o ponto ótimo para o estudo dos cromossomos (MICHALOWSKI, 1963 apud BARCH et al., 1991, p. 18).

A técnica de bandamento dos cromossomos tem sido usada por 20 anos e muitos mecanismos são ainda desconhecidos. De acordo com a Conferência de Paris, em 1971, a banda de um cromossomo é parte do cromossomo que pode ser distinguida de segmentos adjacentes pela coloração mais escura ou mais clara por uma ou mais técnicas. O suplemento da Conferência de Paris descreveu, em 1975, os tipos de bandamento, a técnica e o corante utilizado. Os padrões de bandamento e as nomenclaturas são descritas pelo Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (*International System of Cytogenetic Nomenclature – ISCN*) e são referenciadas nos laboratórios de citogenética (GUSTASHAW, 1991, p. 205).

### **3.9.1. Técnicas de bandamento cromossômico**

O bandamento cromossômico é obtido por meio do tratamento de uma lâmina contendo células metafásicas com soluções especiais, de modo a corar, diferencialmente, regiões específicas dos cromossomos, permitindo a identificação de anomalias estruturais. Dentre as diversas técnicas de bandamento, as mais comumente utilizadas para o diagnóstico são: bandamento G, evidenciando as sub-bandas cromossômicas e bandamento C que evidencia as regiões de heterocromatina constitutiva (BARCH, et al., 1991).

#### **3.9.1.1. Bandamento G ou método de coloração GTG**

O princípio da técnica consiste na obtenção do grau de digestão enzimática desejado para marcação das sub-bandas ao longo de cada cromossomo. O protocolo para banda G é feito após 48 horas de confecção da lâmina (tempo de vida útil das lâminas) para a obtenção de melhores resultados. Essa técnica é

importante para determinar o pareamento correto dos cromossomos, assim como alterações estruturais terminais e intercalares (GUSTASHAW, 1991).

A técnica de bandamento com Giemsa foi introduzida por Seabright (1971) e deduziu-se que as bandas positivas possuem DNA rico em bases adenina (A) e timina (T) e ricas em pontes dissulfídicas, apresentando bandas escuras; enquanto as bandas G negativas, com coloração clara, eram relativamente ricas em sulfidrila. Mais tarde, nenhuma relação entre os padrões de bandas e proteínas dissulfídicas e grupos de proteínas sulfidrílicas foi encontrada ao longo dos cromossomos (GUSTASHAW, 1991). Pelo método de bandamento G, é possível diferenciar a morfologia do cromossomo Y nos bovinos machos, apresentando-se, na subespécie *Bos taurus taurus*, como cromossomo submetacêntrico, e no *Bos taurus indicus*, como cromossomo acrocêntrico (BARCH, et al., 1991).

### **3.9.1.2. Bandamento C ou método de coloração CBG**

Esta técnica de coloração evidencia as regiões ricas em heterocromatina constitutiva, localizadas em grande parte ao redor dos centrômeros, podendo ser encontradas também em outras regiões dos cromossomos como, nos braços curtos ou regiões satélites. Estas áreas contêm DNA altamente repetitivo, que são replicados tardiamente e podem exibir polimorfismo inter e intraespecífico (SUMNER, 1972). O processo é baseado no tratamento com solução alcalina como o hidróxido de bário [Ba(OH)<sub>2</sub>], com uma solução salina de citrato de sódio (2XSSC), tampão fosfato [K<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>], pH 6,8 e solução de corante Giemsa a 3% (BARCH, et al., 1991).

### **3.9.2. Análise citogenética em animais infectados pelo papilomavírus**

Estudos relatam a ocorrência de aberrações cromossômicas em cultura de linfócitos de sangue periférico de bovinos infectados pelo BPV, após o consumo ou não de substâncias carcinogênicas da samambaia do campo (*Pteridium aquilinum*) e independentemente do desenvolvimento da hematúria enzoótica bovina (STOCCO DOS SANTOS et al., 1998, p. 2127). Aberrações cromossômicas também foram

observadas em consumidores de samambaia do campo (Figura 4) (RECOUSO et al., 2003, p. 6).



Figura 4. Aberração cromossômica detectada em cultura de linfócitos de curta-duração obtidos de consumidores da *Pteridium aquilinum*. A) Lesão cromossômica; B) rearranjos cromossômicos; C) quebra de cromossomos (RECOUSO et al., 2003).

Os fatores clastogênicos da *Pteridium aquilinum*, quercetina e ptaquiloside, estavam presentes nas amostras de soro, urina e leite dos bovinos portadores da hematúria enzoótica crônica.

Foram encontradas na análise citogenética, aberrações cromossômicas descritas como: quebras de cromossomos, quebras de cromátides, fragmentos e rearranjos cromossômicos. Esses animais apresentavam câncer de bexiga e, após investigação molecular, constatou-se a presença de sequências de DNA do vírus do papiloma tipo 2, *Bovine papillomavirus 2* (BPV-2). A correlação dos dados sugeriu que o BPV-2, em conjunto com a samambaia do campo, age sinergicamente na produção da instabilidade cromossomal (LIOI et al., 2004, p. 233).

Recentes pesquisas têm revelado a presença do DNA do BPV nos linfócitos de bovinos com ou sem sinais de papilomatose, e DNA de HPV tem sido encontrado nas células sanguíneas de mulheres com infecção de HPV urogenital e câncer cervical, propondo os linfócitos como sítio de latência viral (CAMPO, 2002; CAMPO et al., 2004). Estudos coordenados por Campo et al. (1994) e Stocco dos Santos et al. (1998, p. 2127) detectaram, experimentalmente, sequências de DNA do BPV no sangue periférico de bovinos não afetados clinicamente pela papilomatose, apresentando aberrações cromossômicas em níveis elevados (Figura 5).



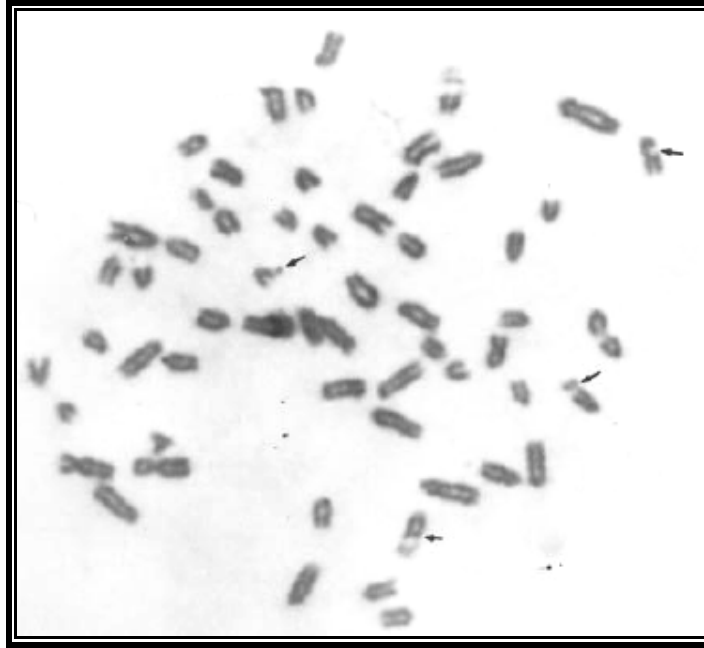


Figura 5. Aberrações cromossômicas estruturais em metáfase obtida a partir de cultura de curta duração dos linfócitos do sangue periférico de bovino. As setas indicam lesões cromossômicas (STOCCO DOS SANTOS, et al., 1998).

Anomalias citogenéticas e aberrações cromossômicas estruturais e numéricas, como endoreduplicações (processo mediante o qual, na fase S do ciclo celular, o núcleo não sofre mitose, iniciando-se um novo período S, que resulta em cromossomos com 4, 8, 16, cromátides), “gaps” ou intervalos, ruptura de cromátides, anéis cêntricos e cromossomos dicêntricos, foram observadas em queratinócitos humanos e em células de camundongos transfectados com o oncogene E7 do HPV-16 (PAZ Y MINO et al, 1992 apud STOCCO DOS SANTOS et al., 1998, p. 2128). Fragilidade cromossômica foi detectada em linfócitos de mulheres com lesões no colo do útero, após terem sido submetidas a tratamento para HPV. Os achados e registros da presença de sequências de DNA do BPV nos linfócitos dos bovinos (CAMPO et al., 1994) e sequências de DNA do HPV nos linfócitos de mulheres com câncer de colo uterino (PAO et al., 1991 apud STOCCO DOS SANTOS, et al., 1998, p. 2133) sustentam a possibilidade do PV como causa da fragilidade cromossomal (STOCCO DOS SANTOS et al., 1998, p. 2133).

De modo geral, os vírus possuem habilidade de penetrar nas células por diferentes mecanismos, induzindo a instabilidade cromossomal, e alguns deles

contribuem para o desenvolvimento das células cancerosas (DUELLI e LAZEBNIK, 2007, p. 968). O mecanismo mais aceito para justificar a instabilidade cromossomal é a interação do HPV com a cromatina da célula hospedeira, que ocorre quando seu DNA circular se associa às histonas celulares, sendo capaz de expressar os genes ORFs. O genoma viral se integra aos cromossomos mitóticos, pela ação do gene E2, possibilitando a segregação do genoma episomal entre as células-filhas hospedeiras, garantindo a sua replicação e manutenção estável do genoma viral dentro da célula hospedeira e ao longo da proliferação celular (Mc PHILLIPS et al, 2006, p. 9530). Essas células infectadas pelo HPV expressam seus oncogenes virais (E6 e E7) que inativam as funções dos genes supressores tumorais e induzem a formação de aberrações cromossômicas, interferindo no mecanismo de controle *checkpoint* G1 e G2 freando a divisão celular (CHANG et al., 1997; COURSEN et al., 1997). No caso do BPV, o mecanismo é diferente. Dados experimentais mostram que o BPV não é capaz de se associar com os cromossomos mitóticos, através da proteína E2, sendo esse mecanismo menos estudado (Mc PHILLIPS et al, 2006, p. 9530).

Jaggar et al. (1990 apud LEAL et al., 2003, p. 16) desenvolveram um modelo de estudo citogenético em linhagens celulares derivadas do palato de bovinos que foram expostas as oncoproteínas virais e ao tratamento com quercetina. Após o período de exposição, essas células exibiram o aumento das taxas de quebras, associações cromossômicas (Figura 6) e o aparecimento de marcadores metacêntrico e submetacêntrico, que estão associados às regiões centroméricas com provável envolvimento das sequências teloméricas, sem a perda dos segmentos de heterocromatina (LEAL et al., 2003, p. 16). Nas infecções pelo HPV, além das anomalias estruturais, segundo Mansur e Androphy (1993, p. 332), observam-se *in vitro*, nas células transformadas pelos oncogenes virais e nos cânceres cervicais, alterações numéricas caracterizadas por aneuploidias, com o aumento (hiperplóidia) e a diminuição (hipoplóidia) de parte do número diploide de cromossomos. Em análise, as alterações cromossômicas foram destacadas no trabalho de Leal et al. (2003), com as técnicas de bandamento G, para identificar segmentos cromossômicos específicos envolvidos em rearranjos, e pelo bandamento C convencional, para avaliar a manutenção das regiões centroméricas C-positivas (LEAL et al., 2003, p. 17).

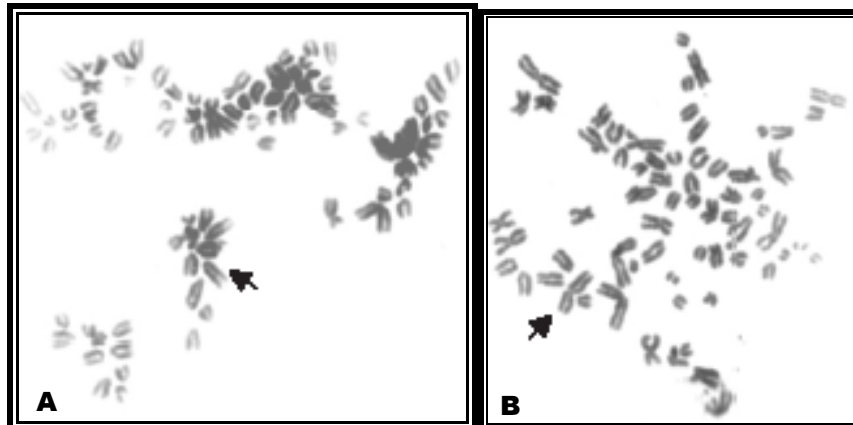


Figura 6. Célula do oncogene E7 do *Bovine papillomavirus* 4 (BPV-4) associado ao gene *ras* (E7R) e célula do oncogene E7 do BPV-4 associado à quercetina (E7Q). As setas em A indicam associação de cromossomos e em B um marcador cromossômico (RECOUSO et al., 2003).

### 3.9.3. Mecanismos de efeito citopático e regulação dos *checkpoints* mitóticos

Sabe-se que, em todas as papilomavíroses, a atividade mitótica das células epiteliais de mucosa e tecido cutâneo é capaz de manter o genoma viral em baixo número de cópias em infecções persistentes (Mc PHILLIPS et al., 2006, p. 9530). Thompson et al. (1997, p. 3026) relatam a habilidade das oncoproteínas virais DNA do PV em interferirem nos *checkpoints* mitóticos. Esses *checkpoints* são normalmente ativados quando ocorre um evento, como a quebra no DNA, acionando as células a entrarem na fase S ou mitose, para reparar o dano celular (Figura 7).

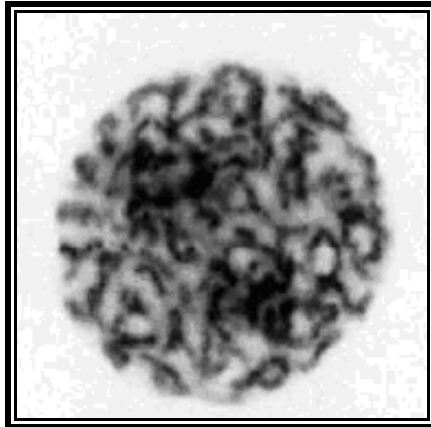


Figura 7. Célula de cromossomos condensados prematuramente (PCC) com fenótipo semelhante à prófase observado em células *HeLa* (cultura de células cancerosas humana *Henrietta Lacks*) (TRIMBORN et al., 2004).

Nas infecções de HPV, a interação dos oncogenes virais, E6 e E7, com os genes supressores tumorais, p53 e pRb, respectivamente, é um ponto crucial na promoção da transformação celular. Esses mesmos genes supressores são compartilhados com outros vírus tumorais DNA, como o *Simian virus 40* (SV40). Similar à ação do papilomavírus, possuem oncoproteínas que interagem com a p53 e pRb e interrompem os *checkpoints* mitóticos, mediando a oncogênese celular (THOMPSON et al., 1997, p. 3026). Este vírus tumorigênico pertence à mesma família *Papovaviridae*, na qual antigamente o papilomavírus era classificado. O SV40 foi descrito pela primeira vez em 1960 por Sweet e Hilleman (1960 apud WITTMANN, 1999, p. 317), ao detectarem o efeito citopático viral pela formação de vacúolos citoplasmáticos em culturas de células renais de primatas Rhesus e *Cynomolgus*, como portadores assintomáticos da infecção.

De modo geral, os vírus com genoma DNA adotam estratégias para facilitar sua replicação e maturação nas células hospedeiras, utilizando a maquinaria de replicação celular. Pequenos vírus DNA, tais como o SV40 e o papilomavírus, modulam as vias de controle do ciclo celular e promovem a entrada na fase S, permitindo que a DNA polimerase do hospedeiro possa ser usada para a replicação

viral (LU et al., 2006 apud LEE et al., 2007, p.5166). Além do PV e SV40, a habilidade para induzir a condensação cromossômica é conservada em outros vírus como o herpesvírus, por exemplo, (LEE et al., 2007, p.5166). Classificado na família *Herspesviridae*, o *Epstein-barr virus* (EBV), após sua infecção primária, torna-se latente e seu genoma circular episossomal replica-se durante a fase S do ciclo celular (LEE et al., 2007, p.5166).

A primeira observação de cromossomos condensados prematuramente ou condensação prematura dos cromossomos (*premature chromosome condensation - PCC*) foi registrada em células infectadas por vírus, mediada pela fusão de células na intérfase com células mitóticas (KATO e SANDBERG, 1967, apud GOTOH e DUARTE, 2006, p. 297). A morfologia da PCC decorre da fase específica em que a célula se encontra na intérfase do ciclo celular no momento da fusão. Células exibindo apenas uma cromátide por cromossomo foram consideradas típicas da fase G1 (Figura 8A), células que apresentavam duas cromátides por cromossomo foram classificadas na fase G2 (Figura 8B), e as configurações de células com aparência pulverizada foram descritas na fase S (Figura 8C) (RAO et al., 1981, p. 49). A condensação prematura da cromatina na fase S, pela fusão com células mitóticas, também resulta em imagens com configuração fragmentada em resposta à perda do cerne cromossômico ou quebra deste (STUBBLEFIELD, 1981, p. 73).

A aparência da cromatina pulverizada tem sido associada a fragmentos cromossomais induzidos pelo vírus (KATO e SANDBERG, 1967, apud GOTOH e DUARTE, 2006, p. 297). Mais tarde, Johnson e Rao (1970), experimentalmente, fusionaram células na intérfase nas fases G1, S e G2 com células mitóticas, usando o *Sendai vírus*, e observaram que a aparência da cromatina condensada dependia da fase das células em intérfase no momento da fusão. Concluíram que a cromatina na intérfase foi condensada prematuramente e nomearam pela primeira vez o fenômeno como condensação prematura dos cromossomos (GOTOH e DUARTE, 2006, p. 303). A partir de meados da década de 70, a PCC foi reconhecida como ferramenta para a investigação da dinâmica cromossomal nos estudos citogenéticos radioativos e nos estudos de replicação cromossômica (GOTOH e DUARTE, 2006, p. 303).

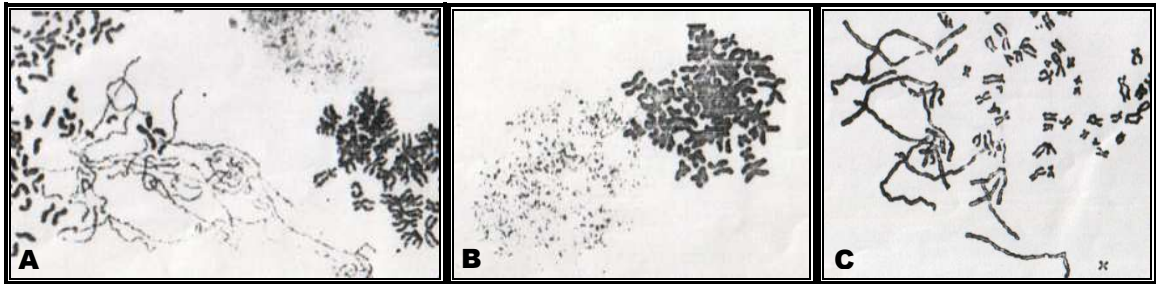


Figura 8. Cromossomos condensados prematuramente (PCC). A) G1-PCC com uma cromátide; B) S-PCC com aparência pulverizada; C) G2-PCC com duas cromátides (SPERLING e RAO, 1974, apud RAO et al., 1981).

Atualmente, a condensação prematura dos cromossomos pode ser detectada pela microscopia confocal, a exemplo do estudo de Ito et al. (2002, p. 2377), no qual o DNA cromossomal foi marcado com bromodamina (Brd) e indicou forte colocalização com o antígeno 1 nuclear do vírus EBV, marcado com proteína fluorescente. A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (PCC-FISH) tem sido empregada na análise da PCC, para melhor detecção de quebra nos cromossomos dos linfócitos do sangue periférico (LEE et al., 2007, p. 5166).

Severa fragmentação foi observada nos linfócitos por indução de PCCs, quando células de hamsters entraram em mitose longo tempo após irradiação, sugerindo conversão da quebra do DNA na quebra cromossômica durante a transição da fase G1/S no ciclo celular (TERZARDI e PANTELIAS, 1997, p. 271).

Recentemente, procedimentos químicos têm sido desenvolvidos para induzir a PCC, usando inibidores de proteínas fosfatases, tais como: cafeína (THOMPSON et al., 1997, p. 3034), metil metanosulfanato (*methyl methanosulfanate* – MMS) (GARCIA et al., 2001, p.121), citocalasina B (TRIMBORN et al., 2004, p. 2041) (Figura 9 a e b), endotal e cantaridina (GOTOH, 1996 apud GOTOH e DURANTE, 2006, p. 300), e ácido okadaico (GOTOH e DURANTE, 2006, p. 299). Lesões no DNA celular produzidas pela camptotecina (*camptothecin* – CPT) induzem fragmentos cromossômicos na condensação prematura dos linfócitos do sangue periférico em humanos (MOESSO et al., 1999 apud GARCIA et al., 2001, p. 124).

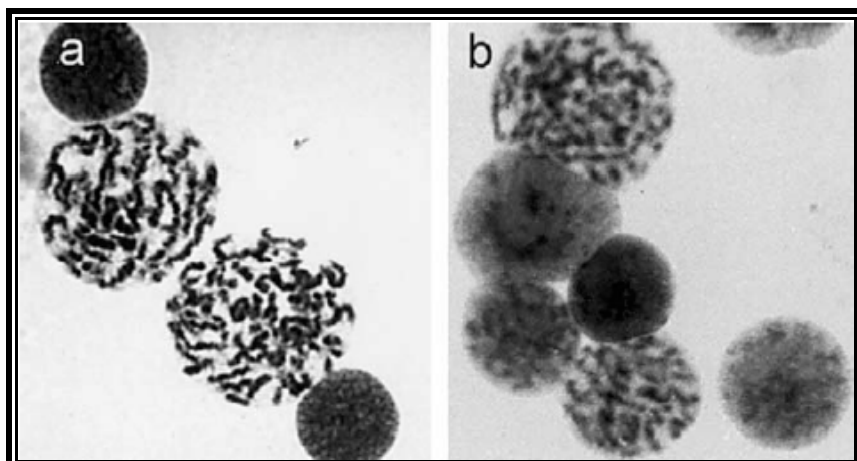


Figura 9. Cromossomos condensados prematuramente (PCC) semelhantes à prófase. São mostradas células nos linfócitos do sangue periférico dos pacientes com microcefalia primária (a) e pacientes com síndrome PCC (b) (TRIMBORN et al., 2004).

A PCC pode ser também induzida quimicamente pela caliculina A, quando adicionada nos linfócitos do sangue periférico de pacientes com câncer pulmonar submetidos ao tratamento radiotativo (LEE et al., 2004, p. 195). Em demonstrações de interrupção dos *checkpoints* mitóticos, sob influência da administração de drogas e seus fatores químicos indutores de PCC, tem sido esclarecidas questões sobre falhas no mecanismo de controle celular. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estão tão bem elucidados (GOTOH e DUARTE, 2006, p. 303).

A técnica de PCC induzida quimicamente pode detectar fragmentação dos cromossomos, que reflete, em algumas circunstâncias, estágios pré-apoptóticos (GARCIA et al., 2001, p. 131). Garcia et al. (2001, p.121) sugerem que a fragmentação cromossômica observada na PCC (fase G1) dos linfócitos do sangue periférico de humanos está mais relacionada com o início da morte celular apoptótica, induzida pelo tratamento químico com MMS.

Apesar de ser considerado um evento raro, a detecção da PCC pode indicar a presença de células cancerosas, como já foi detectado em câncer do cólon (REICHMANN e LEVIN, 1981, apud DUELLI e LAZEBNIK, 2007, p. 971), câncer de bexiga (ATKIN, 1979 apud DUELLI e LAZEBNIK, 2007, p.971), câncer de cérvix (SREEKANTIAH et al., 1987 apud DUELLI e LAZEBNIK, 2007, p. 971), câncer de

ovário (MILES e WOLINSKA, 1973 apud DUELLI e LAZEBNIK, 2007, p. 971), entre outros (DUELLI e LAZEBNIK, 2007, p. 968).

Os mecanismos da condensação dos cromossomos têm sido intensamente investigados. Condensinas, histona H1, quinases e topoisomerase II são algumas moléculas-chave no mecanismo de indução celular de PCC (LEE et al., 2007, p. 5170). Ciclinas dependentes de quinases (cdks) governam a progressão do ciclo celular em eucariotos. Nas células de mamíferos, a transição das fases G1/S e G2/M são reguladas por distintos complexos cdk/ciclina. Em conjunto com cdc2, as ciclinas A e B regulam a entrada na mitose (PINES, 1996 apud THOMPSON et al., 1997, p. 3027).

A ativação da cdc2 é mediada por um complexo que inicia com o aumento da ciclina B1 na fase S e G2, pela presença do EBV (LEE et al., 2007, p.5170). A atividade ciclina dependente de quinase na fase S aumenta durante a replicação viral, enquanto a replicação do DNA celular é inibida (KUDOH et al., 2004 apud LEE et al., 2007, p. 5166). Evidências genéticas e bioquímicas sugerem que a condensina, complexo de subunidades protéicas, e a DNA Topoisomerase II (TOPOII), constituinte essencial para a condensação mitótica, desenvolvem papel importante na montagem e organização dos cromossomos mitóticos (LEE et al., 2007, p. 5170).

A exemplo das *Gamaherpesvirus* Kinases, que podem induzir múltiplos eventos mitóticos prematuros para produzir mais espaços extracromossomais para a replicação do DNA viral (LEE et al., 2007, p. 5166), o papilomavírus, em populações de células, expressando E6 no HPV-16, em foi detectado o aumento da atividade kinase cdc2 associada à histona H1 (THOMPSON et al., 1997, p. 3027).

A enzima ATR, pertencente à família quinase, é capaz de prevenir a indução celular a PCC via regulação do *checkpoint* G1. Contudo, as células cancerosas e a perda da função da p53 provocam a inibição da ATR e, conseqüentemente, interferem no *checkpoint* G1, sensibilizando as células à formação de PCC (Figura 10) (NGHIEM et al., 2001, p. 9092). As substâncias químicas, tais como a cafeína, também possuem a habilidade de inibir proteínas kinases como a ATR (NGHIEM et al., 2001, p. 9092). A ATR, após ser recrutada para a replicação celular, sinaliza que a síntese de DNA não está completa e que a condensação da cromatina não pode ser iniciada. Dessa forma, o *checkpoint* G1 é interrompido pela superexpressão de



ciclinas, induzindo as células a entrarem na fase S, quando os danos celulares não são reparados (NGHIEM et al., 2001, p. 9092).

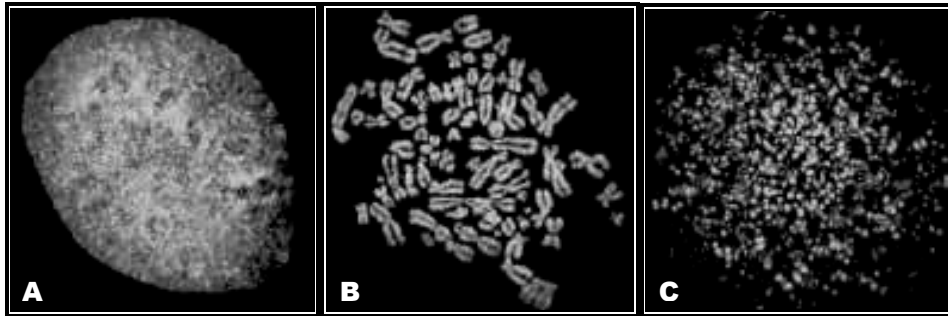


Figura 10: Inibição do *checkpoint* 1 ou da enzima reguladora ATR exibindo células de cromossomos condensados prematuramente (PCC) em baixas doses de quebra de DNA ou resultantes da interrupção da divisão celular na fase S. A) célula na intérfase; B) mitose normal; C) condensação prematura da cromatina (NGHIEM et al., 2001).

#### 3.9.4. Descrição do complemento cromossômico de bovinos, caninos e equinos

A morfologia e o tamanho dos cromossomos são característicos de cada espécie e, quando dispostos aos pares e ordenados pela morfologia, constituem o cariótipo (GIANNONI e LUI, 1988).

O estudo cariotípico dos bovinos, feito por Melander (1959 apud GOLDSCHMIDT, 1982), em células de pulmão de feto, demonstrou que o complemento cromossômico da subespécie *Bos taurus taurus*, bovino de origem européia,  $2n = 60$ , sendo constituído de 29 pares de autossomos acrocêntricos e um par de cromossomos sexuais submetacêntricos, sendo o cromossomo Y do tamanho do menor autossomo, e o cromossomo X, um dos maiores cromossomos do cariótipo (Figura 11).

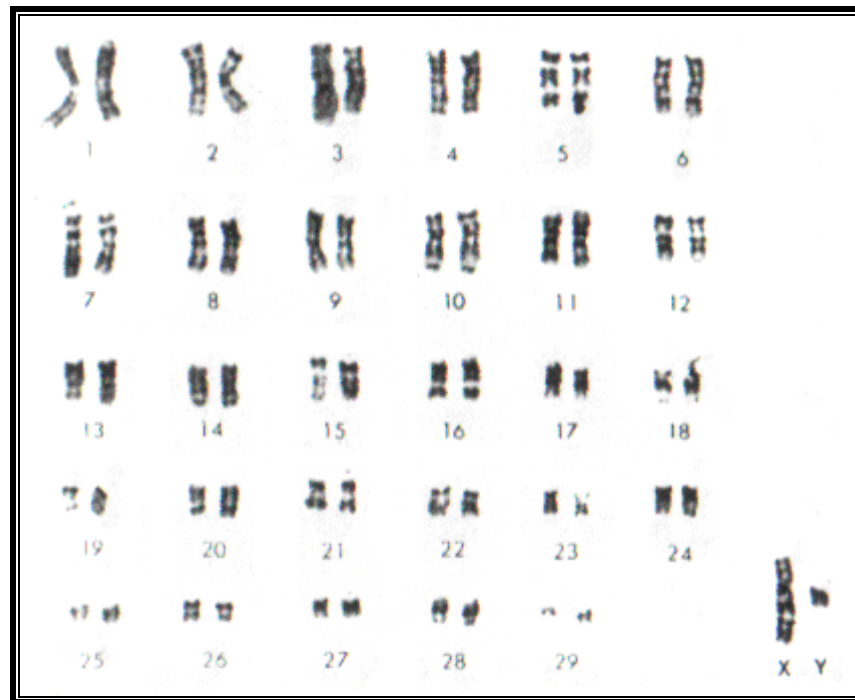


Figura 11. Cariótipo normal de bovino macho com bandamento G ( $2n = 60,XY$ ) apresentando 29 pares de autossomos acrocêntricos e um par de cromossomos sexuais submetacêntricos (NICHOLAS, 1997).

Rothfels et al. (1959 apud GOLDSCHMIDT, 1982) estabeleceram o cariótipo do equino doméstico (*Equus caballus*), que consiste de um número diploide ( $2n = 64$ ), sendo, nas fêmeas, 28 cromossomos metacêntricos e submetacêntricos e 36 acrocêntricos, e nos machos, 27 metacêntricos e submetacêntricos, além de 37 acrocêntricos. O cromossomo X foi identificado por Lui (1988 apud GOLDSCHMIDT, 1982) como segundo submetacêntrico em tamanho, e o cromossomo Y como sendo um dos menores acrocêntricos (Figura 12).

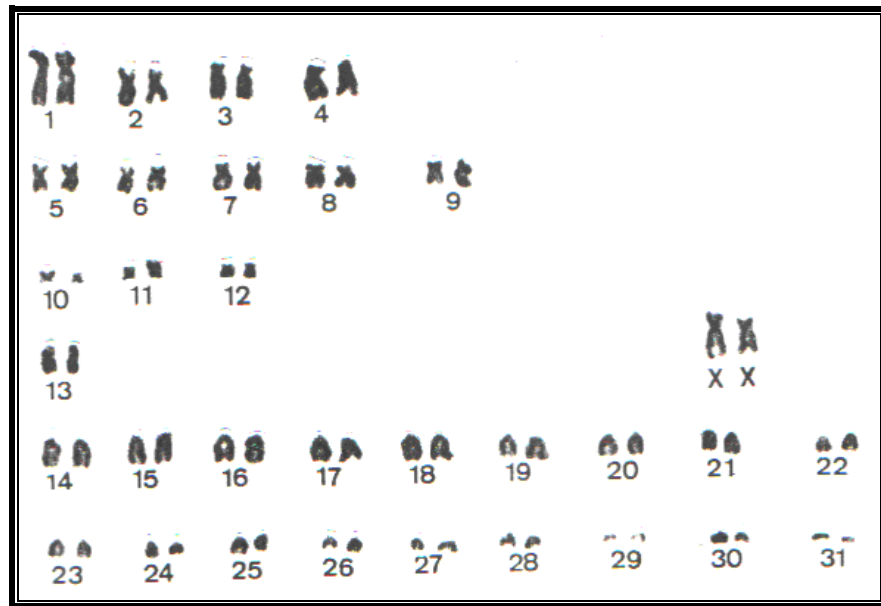


Figura 12. Cariótipo normal de equino fêmea ( $2n = 64,XX$ ) (BARBOSA, 1997).

O número diploide de cromossomos do cão doméstico (*Canis familiaris*) é  $2n = 78$  cromossomos. O cariótipo do cão compreende 38 pares de autossomos acrocêntricos (Figura 13). As fêmeas apresentam um par de cromossomos sexuais XX submetacêntricos, e os machos apresentam um cromossomo Y submetacêntrico, sendo o menor do complemento (HARE et al., 1966 apud MELLINK e BOSMA, 1989). O cariótipo parece ser idêntico em todas as raças de cães, com exceção do cromossomo Y, que é descrito como acrocêntrico em alguns relatos (HSU e BENIRSCHKE, 1967 apud MELLINK e BOSMA, 1989).

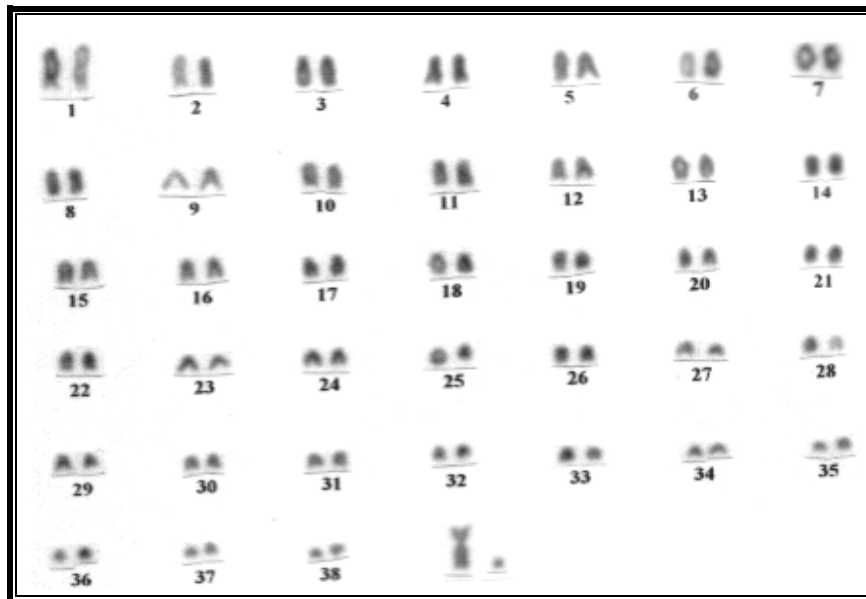


Figura 13. Cariótipo normal de canino macho ( $2n = 78,XY$ ). Os 38 pares de autossomos são acrocêntricos (SMITH et al., 1989 apud SOUZA, 2003).

A Tabela 5 descreve os cariótipos das espécies *Canis familiaris*, *Bos taurus* e *Equus caballus*, identificando o número de cromossomos autossomos e sexuais dos animais em estudo.

Tabela 5. Descrição do padrão cariotípico de caninos, bovinos e equinos domésticos.

Espécie	2n (Número diploide)	Autossomos		Sexuais	
		Metacêntrico	Acrocêntrico	X	Y
Canino ( <i>Canis familiaris</i> )	78 (39 pares)	0	38	SM	A
Bovino ( <i>Bos taurus</i> )	60 (30 pares)	0	29	SM	SM
Equino ( <i>Equus caballus</i> )	64 (32 pares)	13	18	SM	A

SM = Submetacêntrico; A = Acrocêntrico (NICHOLAS, 1987)

### 3.10. Modelos animais

Estudos *in vivo* têm sido constantemente realizados para avaliar a biologia do PV e a resposta imune no hospedeiro frente à infecção viral (NICHOLLS et al., 2001; CAMPO, 2002).

O cão tem sido o modelo mais apropriado para o estudo da imunidade induzida pelo HPV, em virtude de desenvolver lesões morfológicamente similares àquelas vistas nas infecções anogenitais mucosotrópicas do HPV-6 e HPV-11 (NICHOLLS et al., 2001; MOORE et al., 2003). A partir de estudos sobre a biologia e a imunologia que envolvem os PVs mucosotrópicos, o COPV tem sido considerado um importante modelo animal da infecção viral em seres humanos (NICHOLLS et al., 1999; GHIM et al., 2000). Com base em uma série cronológica de amostras de biópsias, pode-se compreender melhor o ciclo da infecção viral, visto que os eventos morfológicos na regressão do papiloma oral canino apresentaram-se similares àqueles vistos na regressão do papiloma de mucosa em humanos (NICHOLLS et al., 2001). BPVs e CRPV também têm sido, por muitos anos, sistema modelo para o estudo da biologia do HPV. A indução de papilomas e as interações de cofatores virais têm sido elucidadas neste sistema (CAMPO, 2002).

Em caninos, a infecção pelo COPV tem sido usada como “modelo-chave” para o desenvolvimento de vacinas virais, incluindo aquelas baseadas nos extratos de papilomas, VLPs e vacinas de DNA envolvidas com L1 (NICHOLLS et al., 2001).

O COPV em modelo da raça *Beagle* tem mostrado utilidade nos estudos de vacinas baseados em L1, para prevenção da infecção pelos PVs mucosotrópicos. Este sistema de modelo pode ser usado para investigar a duração da resposta imune protetora na infecção natural e a otimização de protocolos de vacinação. Aplicações destas pesquisas deverão facilitar o desenvolvimento de uma vacina sistêmica eficaz contra HPVs mucosotrópicos (SUZICH et al., 1995).

Em bovinos, a infecção pelo BPV-1 ou BPV-2 também tem sido usada amplamente, e com sucesso, como modelo para o desenvolvimento de vacinas efetivas contra o PV (ZANINI et al., 2003, p. 219). Numerosos modelos com camundongos têm sido usados para determinar a resposta imune, o potencial de vacinas virais e avaliar as respostas antitumorais. Contudo, nestes modelos, não tem sido possível estudar o efeito do crescimento ou regressão dos papilomas, segundo Moore et al. (2003).

Cobaias (“porquinhos-da-Índia”) e coelhos têm sido imunizados com BPV-1, Canine PV ou Chaffinch PV purificado, para identificar o maior grupo-específico de epítomos das papilomaviroses (DILNER et al., 1991). Embora haja um sistema de modelo animal eficiente para o estudo da patologia cutânea verrucosa, tal como o modelo do CRPV no “coelho da cauda de algodão”, não há ainda um modelo animal apropriado para o estudo das papilomatoses oncogênicas do trato genital (OSTROW et al., 1990, p. 8170).

Estudos complementares têm demonstrado a importância do aspecto biológico na ocorrência de infecções pelo RhPV-1 em macacos Rhesus (fêmeas sexualmente ativas e machos) infectados pelo RhPV-1 que desenvolveram tumores malignos (OSTROW et al., 1990, p. 8170). Neste contexto, isolou-se e caracterizou-se um tipo de PV, oriundo de Rhesus, que parece ser um modelo útil para o estudo da transmissão sexual e da oncogenicidade da infecção pelo PV na genitália de primatas (OSTROW et al., 1990, p. 8170). Com isso, estima-se encontrar um modelo animal de PV, com base em protocolos experimentais e emprego de amostras genitais de macacos Rhesus e macacos de cauda longa, para a pesquisa de doenças causadas pelo HPV (CHAN et al., 1997).

### 3.11. Sinais clínicos e lesões da virose

O papiloma pedunculado é o mais comum em animais jovens, mas também pode ocorrer nos adultos. Caracteriza-se por base de inserção ampla, superfície irregular, cornificada, ausência de pelos e com tamanho de um a 10 cm de diâmetro. Apresenta-se arborescente, friável, semelhante à forma de “couve-flor”, tem coloração escura acinzentada e consistência dura (SANTIN e BRITO, 2003, p. 220). Por outro lado, a forma plana do papiloma é mais freqüente em animais velhos. Constitui-se em uma lesão circular, clara ou escura com aspecto filiforme, de formação achatada e com inserção ampla, que pode apresentar pelos e medir desde 5 a 6 cm de diâmetro (SANTIN e BRITO, 2003, p. 220).

O PV infecta o animal, por meio da solução de continuidade na pele, que se replica no núcleo das células basais do epitélio (BLOOD e RADOSTITS, 1991; JONES et al., 2000). Nestas células, onde não se expressam antígenos virais, o genoma viral é mantido na forma de epissoma, na qual somente os genes iniciais são expressos e estimulam a proliferação das células basais, resultando em hiperplasia, levando à acantose e a um papiloma proeminente, formando-se as “verrugas” (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 710; ROMANOS et al., 2002).

Macroscopicamente, esses tumores múltiplos aparecem brancos ou cinza. Inicialmente, são achatados ou lisos e, mais tarde, são negro-acinzentados, elevados, pedunculados e com superfície queratinizada (JONES et al., 2000). As massas papilomatosas podem exalar odor putrefeito (WITTMANN, 1999, p. 319). Os tumores apresentam aspecto de uma massa grosseira semelhante a uma “couve-flor”, com dimensões variáveis e forma irregular (JONES et al., 2000). A consistência pode ser bastante firme ou a massa papilomatosa pode desprender-se com relativa facilidade. Ainda há uma forma plana, pouco elevada, não pedunculada, bastante firme, acantósica, com hiperqueratose, mas com menor exuberância do conjuntivo e que pode apresentar coilocitose (HARGIS, 1998).

Microscopicamente, os PVs se estabelecem na epiderme ou no tecido conjuntivo subjacente e podem ser demonstrados nas células fibroblásticas. Na epiderme, causam acantose e hiperqueratose (MURPHY et al., 1999; EISA et al., 2000; JONES et al., 2000; HOWLEY e LOWY, 2001), de modo que os cortes histológicos mostram, além da hiperplasia das células do estrato espinhoso que pode ocorrer em alguns estágios, as inclusões intranucleares, contendo partículas

virais. Cortes histológicos mostram também o aumento da eleidina, queratoialina e queratina, que levam a formações nodulares (HARGIS, 1998). A apoptose pode ser verificada em muitas células acantóticas, caracterizadas pela diminuição do citoplasma (ABDOUSLAM et al., 1997, p. 247). As formações nodulares são caracterizadas pela invaginação da epiderme no derma, com projeções denominadas cristas interpapilares ou sulcos papilíferos. O tecido conjuntivo subjacente acompanha o crescimento epitelial, criando dobras e frondes (JONES et al., 2000), não só pelo estímulo viral como para nutrir e suportar mecanicamente a hiperplasia do epitélio (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 710).

Mediante o exame anátomo-histopatológico, torna-se possível estabelecer, morfológicamente, as diferentes formas de papilomas encontradas (SANTIN e BRITO, 2003, p. 220).

### **3.11.1. Sinais clínicos e lesões da virose em animais domésticos**

Em caninos, o COPV induz verrugas semelhantes à “couve-flor” na mucosa oral de cães domésticos, assim como em canídeos silvestres (NICHOLLS et al., 1999, p. 366), podendo acarretar dificuldades na mastigação e deglutição (MURPHY et al., 1999). Acredita-se que o período de incubação na papilomatose canina seja de 30 a 35 dias, com persistência das lesões por algumas semanas (WITTMANN, 1999, p. 311).

Em infecção experimental com COPV, observou-se que, dentro de quatro a oito semanas pós-inoculação, ocorreu o desenvolvimento de papilomas seguido de regressão espontânea imunomediada (NICHOLLS et al., 1999, p. 366). Mais de 95% das lesões pelo COPV regridem dentro de duas a quatro semanas e somente poucos papilomas progridem para lesões mais graves, incluindo o carcinoma oral de células escamosas (GHIM et al., 2000). Podem-se observar papilomas na face, pavilhão auricular e região nasolabial (NICHOLLS et al., 1999, p. 367), podendo estender-se para a mucosa gastrintestinal. Os papilomas apresentam-se numerosos, de forma arredondada, ásperos, e podem ser pedunculados ou planos (WITTMANN, 1999, p. 261).

A infecção pelo PV em cães tem sido associada à formação de papilomas exofíticos e endofíticos, além da associação com carcinoma das células escamosas



na pele e nas membranas da mucosa dos olhos, cavidade oral e trato genital (NET et al., 1997, p. 11; NICHOLLS et al., 1999, p. 365; TANABE et al., 2000, p. 1189). Microscopicamente, as células infectadas com grânulos de queratohialina gigantes são descritas nas lesões papilíferas encontradas nas raças *Pug* e *Schnnauzer* Miniatura (NET et al., 1997, p. 12). Macroscopicamente, a infecção cutânea apresenta coloração branca ou rósea, indicando uma hipopigmentação localizada. Outras vezes, são observados papilomas acinzentados e/ou enegrecidos, derivados de hiperpigmentação, que sugerem um distúrbio na síntese de melanina e/ou nas interações entre melanócitos e queratinócitos (NET et al., 1997, p. 12).

Em felinos, os papilomas apresentam-se como massa nodular ulcerada e localizam-se preferencialmente na região da cabeça, focinho, lábios e orelhas, além do pescoço, abdômen ventral, membros anteriores e posteriores e digitais (SCHULMAN et al. 2001, 2003; HANNA e DUNN, 2003). Clinicamente, os papilomas orais em felinos são multifocais, frequentemente múltiplos (SUNDBERG et al., 2000, p. 4), pequenos, ovalados, achatados, ásperos, comumente encontrados na superfície ventral da língua, mas podem também ser encontrados na região dorsal e na mucosa bucal. As lesões orais medem, geralmente, entre 4 a 8 mm de diâmetro (SUNDBERG et al., 2000, p. 4). As lesões cutâneas medem entre 3 a 5 mm de diâmetro, mas podem alcançar até 2 cm de diâmetro (HANNA e DUNN, 2003).

Os papilomas cutâneos no gato doméstico (*Felis domesticus*) e no leopardo da neve (*Panthera uncia*) apresentam-se ásperos, elevados e pigmentados (independentemente da coloração da pele), e localizados no dorso do animal (SUNDBERG et al., 2000, p. 4). Segundo o estudo de Hanna e Dunn (2003), foram realizadas 1.400 biópsias em felinos e, após análise clínica e microscópica, constatou-se que os tumores eram característicos de fibropapilomas cutâneos.

Histologicamente verificou-se que o epitélio escamoso estratificado diferenciado apresentava-se com todas as camadas suprabasais expandidas. O estrato granuloso é proeminente, quando comparado com o tecido normal. Na camada granulosa, células individuais encontram-se inchadas, pela abundância de citoplasma claro ao redor do núcleo, denominadas quailócitos (SUNDBERG et al., 2000, p. 5; SCHULMAN et al., 2001). Dentro dos coilócitos, são observados queratinócitos degenerados e este achado é característico do efeito citopático viral. E outro efeito citopático é a presença de grânulos citoplasmáticos de queratohialina

largos e irregulares (supostos produtos do gene E4 do PV), ou inclusões citoplasmáticas condensadas, características em queratinócitos degenerados (SUNDBERG et al., 2000, p. 5).

Sucessivos casos de carcinoma das células escamosas *in situ* em gatos domésticos são positivos para antígenos de PV. Ultraestruturalmente, as células neoplásicas apresentam núcleo ovalado e recoberto com fina camada de cromatina, nucléolo usualmente pequeno, grânulos eosinofílicos no citoplasma e células marginais indistintas. Moderado número de células bem diferenciadas e ocasionais eosinófilos aparecem espalhados pelo papiloma. Áreas não ulceradas encontram-se com hiperplasia epidermal moderada, enquanto a massa exofítica encontra-se com a superfície ulcerada na derme subjacente (HANNA e DUNN, 2003). Em diferentes áreas do papiloma, uma série de mitoses é encontrada. Multifocalmente, as células neoplásicas estão perpendicularmente arranjadas na junção dermo-epidermal (SCHULMAN et al., 2001; HANNA e DUNN, 2003).

Em ovinos, os papilomas escamosos filiformes não são fibropapilomas, e sim papilomas exofíticos, circunscritos, que medem entre 15 e 31 mm de diâmetro e se assemelham aos papilomas comuns, ao contrário de descrições anteriores destes papilomas em ovelhas (HAYWARD et al., 1993). Os papilomas comuns, usualmente, são múltiplos, em número maior que 15, medem, em média, entre 2 e 20 mm de diâmetro e, apresentam-se planos e pequenos no início da sua formação, até evoluírem para a forma pedunculada e tornarem-se frequentemente maiores (MOULTON, 1990).

As lesões papilíferas localizam-se preferencialmente nos membros anteriores, focinho, orelha, região perineal, glândulas mamárias e na bolsa escrotal de carneiros com até dois anos de idade, mas podem localizar-se em qualquer região do corpo (HAYWARD et al., 1993). Às vezes, são vistos em grupos lineares nos pilares ruminais e, menos frequentemente, no saco ruminal adjacente (MOULTON, 1990). Gibb et al. (1975 apud HAYWARD et al., 1993) registraram fibropapilomas filiformes na face e nos membros anteriores de ovelhas. Vanselow et al. (1982 apud HAYWARD et al., 1993) descreveram a transformação de papilomas da face em carcinomas das células escamosas em uma ovelha com idade avançada. São raros os casos de fibropapilomas registrados, tendo em vista que a literatura científica traz poucas referências a respeito de papilomas em ovelhas

(MERCK, 2001). Os fibropapilomas, quando diagnosticados em ovinos, acometem principalmente os animais mais jovens na forma escamosa e filiforme, e têm sido designados como tumores benignos que ocorrem em muitos animais, inclusive no homem (HAYWARD et al., 1993).

Os papilomas nos ovinos são, geralmente, caracterizados por hiperqueratose e áreas ocasionais de paraqueratose. O estrato granuloso é notadamente mais espesso, especialmente nas áreas entre as elevações papilomatosas que se formam ao redor de uma fina camada de tecido conectivo alongado. O estrato granuloso contém numerosos grânulos basofílicos de queratohialina intracitoplasmáticos. As células basais evidenciam hiperplasia sem atipia e expansão da camada escamosa. A junção dermo-epidermal encontra-se bem definida e não há acompanhamento da fibromatose dermal. Algumas lesões evidenciam células inflamatórias presentes nos tecidos conjuntivos adjacentes (HAYWARD et al., 1993). Nas verrugas cutâneas de ovinos, pode-se constatar a presença de corpúsculos de inclusão e partículas virais que não são encontrados em amostras tumorais no rúmen.

Em caprinos, os papilomas, geralmente, são múltiplos e numerosos (MOULTON, 1990; YAGER e SCOTT, 1991). De acordo com o local de predileção da infecção viral, as lesões são comumente observadas na pele, especialmente na pele não pigmentada, úbere e tetas (BLOOD e RADOSTITS, 1991). Parece que a infecção é mais severa nas tetas, e capaz de induzir uma transformação maligna (MERCK, 2001). Os papilomas ocorrem também na cabeça, pescoço, membros, região perineal, região vulvar e ventralmente à cauda dos caprinos (MOULTON, 1990). As lesões papilomatosas em caprinos possuem queratinócitos anormais com núcleo vesicular e nucléolo central eosinofílico e largo. Estes queratinócitos, células proliferativas, induzem hiperqueratose e acantose (MANNI et al., 1998). Em adição, os queratinócitos anormais aparecem para projetar-se profundamente na derme, resultando em cristas interpapilares com abundante tecido fibroso, com aparência fibropapilomatosa (MANNI et al., 1998).

Em suínos, a papilomatose, quando observada, afeta, além da pele, as vias digestivas superiores e, principalmente, a mucosa genital de fêmeas e de machos (VITOVEC et al., 1999; SOBESTIANSKY et al., 1999). A papilomatose em suínos pode demonstrar um caráter local ou generalizado (WITTMANN, 1999). As lesões

caracterizam-se como formas neoplásicas multicêntricas, circulares, com elevações cutâneas de superfície irregular e rugosa. Possuem tamanhos variáveis, projetando-se a 1 cm da superfície e atingindo até 3 cm de diâmetro. Podem ser pedunculadas ou filiformes com formações papilares secundárias. A coloração varia de amarronzada a rósea (SOBESTIANSKY et al., 1999). As neoplasias se caracterizam microscopicamente por projeções da epiderme hiperplásica, suportadas por delgados pedúnculos dérmicos. A maioria das células hiperplásicas pertence ao estrato espinhoso e exibe degeneração balonosa (SOBESTIANSKY et al., 1999).

Em bovinos, o BPV causa papilomas de forma plana, pedunculada ou mista na pele (MARINS, 2004, p. 44). Antigamente, acreditava-se que o BPV causava doença local sem produção de viremia (MAYR e GUERREIRO, 1988, p. 466), entretanto, novos achados registraram a presença do BPV em linfócitos do sangue periférico de bovinos, indicando que o vírus permanece em um estado de “latência” e pode ser reativado por qualquer trauma físico ou por imunossupressão (CAMPO et al., 1944, p. 151). A forma pedunculada dos papilomas em bovinos ocorre principalmente em animais jovens, mas pode ocorrer também em adultos. Os papilomas pedunculados têm base de inserção ampla, superfície irregular, cornificada, ausência de pelos e medem entre 1 e 10 cm de diâmetro. Apresentam-se semelhantes à forma de “couve-flor”, com coloração escura acinzentada e consistência dura (SANTIN e BRITO, 2003, p. 220; MARINS, 2004, p. 44). Os papilomas pedunculados são mais visíveis e podem surgir em qualquer região do corpo, mas ocorrem, geralmente, na barbeta, pescoço ou cabeça (MARINS, 2004, p. 58). Já a forma plana dos papilomas é mais frequente em animais mais velhos.

Os papilomas planos em bovinos apresentam-se como lesão circular, de forma achatada, com inserção ampla e aspecto filiforme, de cor clara ou escura, podem apresentar pelos, e medem entre 5 e 6 cm de diâmetro (SANTIN e BRITO, 2003, p. 220; MARINS, 2004, p. 44). Preferencialmente, ocorrem no pescoço e região dorso-lateral do abdômen. Sua visualização pode ser mais difícil, assim, o criador só percebe o problema quando a doença já está em grau avançado, com seu tratamento dificultado. Pode ainda ocorrer a associação das formas pedunculada e plana, pois uma mesma amostra tumoral pode conter mais de uma cepa viral, assim sendo, as lesões assumem aspecto multiforme (MARINS, 2004).

Os papilomas em bovinos variam muito em número, tamanho e forma (WITTMANN, 1999, p. 318). Podem ser únicos ou múltiplos (SILVA et al., 1998,

p. 84), em média aparecem de 10 a 100, mas já foram contados até 220 papilomas em um mesmo animal. Geralmente, quanto maior o número de papilomas, menor é o seu tamanho. O tamanho pode variar de uma lentilha ao da cabeça de uma criança e pode atingir até 30 kg de peso (WITTMANN, 1999, p. 318). Há formas distintas de papiloma em bovinos, segundo a localização no corpo (WITTMANN, 1999, p. 318). A forma cutânea afeta a cabeça, principalmente ao redor dos olhos, pescoço, dorso, região ventral, úbere, extremidades e ao redor dos cascos (MARINS, 2004, p. 55).

Na forma digestiva, os papilomas podem atingir todo o trato gastrintestinal dos bovinos, desde a boca até o abomaso (TSIRIMONAKI et al., 2003). Quando aparecem na base da língua, a alimentação é dificultada, podendo o animal emagrecer e roncar. Já no esôfago, pode ocorrer meteorismo recidivante e timpanismo crônico. Quando os papilomas aparecem no sistema respiratório, como na laringe e traquéia, podem causar estertores audíveis e dispnéia, porém só são diagnosticados quando estão bastante adiantados (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 711). Na forma peniana, os papilomas em bovinos desenvolvem-se na glândula, dificultando a monta natural. A forma vaginal em fêmeas deve ser diagnosticada por palpação do órgão ou inspeção visual. Já os papilomas na bexiga, por palpação retal (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 711).

A papilomatose interdigital afeta os cascos de bovinos, causando claudicação grave e o animal pode permanecer em decúbito ventral por muito tempo. A forma mamária aparece no úbere de vacas leiteiras (WITTMANN, 1999, p. 319) e se torna um fator de predisposição às mastites, pois a infecção pelo BPV resulta em supressão natural dos mecanismos de defesa do úbere (HEMMATZADEH et al., 2003). Os diferentes tipos de BPV tendem a induzir papilomas em distintos locais anatômicos (DESROCHERS et al., 1994, p. 647). BPV-1 ocorre nas tetas e pênis. BPV-2 é muito comum, aparece elevado e pedunculado, com superfície córnea. BPV-1 e BPV-2 causam fibropapilomas, afetam bovinos jovens, com menos de dois meses de idade e, usualmente, regridem espontaneamente (DESROCHERS et al., 1994, p. 647). Os papilomas causados pelo BPV-3 podem aparecer em qualquer lugar do corpo, tendem a ser achatados, planos e circulares, e tipicamente têm projeções em suas superfícies. As verrugas do trato gastrintestinal são causadas somente pelo BPV-4 (DESROCHERS et al., 1994, p. 647).

Dentre os tipos do BPV (Tabela 6), o papiloma causado pelo BPV-5 é chamado de “grão de arroz”, por ter pequeno tamanho e aspecto filiforme. Este aparece nas tetas de vacas de qualquer idade e não regride espontaneamente (DESROCHERS et al., 1994, p. 647; ONIONS, 1997). O BPV-6 ocorre na parte dorsal e ventral do espaço interdigital de bovinos de qualquer idade e raça, suas lesões papilomatosas também não regridem espontaneamente (DESROCHERS et al., 1994, p. 647). Acantose e hiperqueratose ocorrem nas células da epiderme ou no tecido conjuntivo subjacente infectado pelo BPV e podem também ser encontradas nas células fibroblásticas (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 710; MURPHY et al., 1999; EISA et al., 2000). Invaginações da epiderme no derma, com projeções conhecidas como cristas interpapilares, são características das formações nodulares, que se desenvolvem devido à hiperplasia das células da epiderme, à presença de inclusões intranucleares contendo partículas virais e ao aumento de eleidina, queratohialina e queratina. O crescimento epitelial é acompanhado pelo tecido conjuntivo subjacente devido ao estímulo viral e também para que haja nutrição e suporte mecânico da hiperplasia celular (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 710; JONES et al., 2000) (Tabela 6).

Tabela 6. Características dos tipos virais do papilomavírus em bovinos

Gênero	Tipo	Neoplasia	Cofator	Célula
<b><i>Deltapapillomavirus</i></b>	BPV 1	Fibropapiloma Benigno	Ausente	Fibroblastos e queratinócitos
	BPV 2	Fibropapiloma Maligno	<i>Pteridium aquilinum</i>	Fibroblastos e queratinócitos
<b><i>Epsilonpapillomavirus</i></b>	BPV 5	Fibropapiloma Benigno	Ausente	Fibroblastos e queratinócitos
<b><i>Xipapillomavirus</i></b>	BPV 3	Papiloma Benigno	Ausente	Epiteliais
	BPV 4	Papiloma Maligno	<i>Pteridium aquilinum</i>	Epiteliais
	BPV 6	Papiloma Benigno	Ausente	Epiteliais

Segundo o Comitê de Nomenclatura do Papilomavírus, ficou estabelecido, durante a Conferência Internacional do Papilomavírus em Quebec, Canadá, em 1995, que um novo tipo de PV é considerado validado somente quando a sequência do gene L1 for inferior a 90% de similaridade com o gene L1 de todos os tipos de PVs conhecidos. Com isso, novas sequências foram isoladas e denominadas novos tipos prováveis de PV. Atualmente, os novos tipos prováveis, designados *Bovine alimentary papillomavirus* – BAPV-1 a BAPV-10, foram amplificados usando *primers* FAP59/FAP64 e sequências de DNA dos outros novos tipos prováveis, designados BAPV-6MY e BAPV-11MY, foram amplificados com os primers MY09/MY11 (OGAWA et al., 2004, p. 2192).

Além dos 11 novos prováveis tipos de papilomavírus, foram detectados, pelo método de PCR, nas regiões altamente conservadas do gene E1, outros cinco tipos, designados *Bovine adeno-associated virus* – BAA-1 a BAA -5. Tem sido sugerido que BAA-1 e BAA-5 estão estritamente relacionados com BPV-3, -4 e -6. Por outro lado, os BAA-2, -3 e -4, encontram-se distantes filogeneticamente em relação aos BPVs conhecidos (Tabela 7) (TOMITA et al., 2007). Pela análise filogenética dos tipos prováveis de BPVs, mostrou-se que BAPV-2 e -4; e BAA-5,

BAPV- 1, -3, -10 foram indicativas para classificação no gênero *Delta* e *Xipapillomavirus*, respectivamente, e que o BPV-3c é considerado um subtipo ou variante do BPV-3 (TOMITA et al., 2007, p. 232).

Tabela 7. Similaridade das sequências dos nucleotídeos dos novos prováveis tipos de papilomavírus bovino (*Bovine alimentary papillomavirus* – BAPV) estritamente relacionados com estes e com *Bovine papillomavirus* – BPV.

<b>Novo Tipo Provável de PV</b>	<b>Tamanho (bp)</b>	<b>Relação</b>	<b>BPV ou Novo Tipo Similaridade (%)</b>	<b>Relação</b>	<b>BPV Similaridade (%)</b>
BAPV 1	411	BPV -3	74	BPV -3	74
BAPV 2	413	BPV- 5	75	BPV- 5	75
BAPV 3	416	BAPV 10	74	BPV- 3	74
BAPV 4	410	BAPV 2	79	BPV- 5	75
BAPV 5	414	BAPV 6	69	BPV- 3	64
BAPV 6	414	BAPV 5	69	BPV- 6	64
BAPV 7	408	BAPV 5	67	BPV- 3	62
BAPV 8	410	BAPV 3	69	BPV-4, -6	68
BAPV 9	407	BAPV 1	73	BPV- 3	71
BAPV 10	410	BPV- 3	74	BPV 3	74
BAPV 11 MY	405	BAPV 6MY	61	BPV 3	60

(OGAWA et al., 2004)

Variações quanto ao tamanho em bp dos fragmentos amplificados ocorrem em diferentes espécies e entre espécies (Tabela 8). Em humanos, foram detectados 12 novos tipos de HPVs, com diferentes tamanhos dos fragmentos gerados por PCR a partir dos *primers* degenerados FAP59/FAP64, desenhados pelos pesquisadores suecos Forslund et al. (1999). A posição dos iniciadores corresponde aos nucleotídeos 5981-6001 e 6458-6436 do genoma do HPV-8, amplificando um fragmento de 478 bp. Foram encontradas bandas fracas para HPV -5, -33, -38, -56, -67 e -72. Nenhuma banda foi detectada para o HPV-1, -2, -35, -41, -44, -55, -63,



-71 e -74 (FORSLUND et al., 1999, p. 2439). HPV-40 e HPV-58 geraram amplicons de 740bp e 264bp, respectivamente (FORSLUND et al., 1999, p. 2442). Em bovinos, 11 novos prováveis tipos de BPVs foram detectados, utilizando-se o mesmo par de oligonucleotídeos, amplificando os fragmentos com variações de 405 a 416 bp e empregando idêntica metodologia de PCR (OGAWA et al., 2004). Em caninos, Nicholls et al. (1999) detectaram bandas inferiores a 1.000 bp, correspondentes à amplificação do gene L1 em amostras de COPV. Em animais silvestres, o peixe-boi (*Trichechus manatus latirostris*) foi identificado molecularmente pelos iniciadores MY09/MY11, específico para amostras tumorais de mucosa em humanos, gerando banda de 458bp de tamanho (WOODRUFF et al., 2005). E, no estudo de Antonsson e Mc Millan, (2006), foi isolado o genoma do animal australiano Koala, amplificandose o fragmento de 440 bp, utilizando os *primers* genéricos FAP59/FAP64. Na recente pesquisa do PV em urso polar (*Ursus maritimus*), foi detectado, pela utilização de múltiplos *primers* associados à enzima de restrição *Pst*I, cinco fragmentos, amplificando bandas de 500bp, 700 bp, 1.500 bp, 2.300 bp e 2.600 bp de tamanho (STEVENS et al., 2008).

Tabela 8. Comparação dos tamanhos dos amplicons gerados quanto às espécies de PV e ao par de *primers* utilizado na reação de PCR.

<b>Espécie</b>	<b>Tipo</b>	<b>Primer</b>	<b>Tamanho (bp)</b>	<b>Referência</b>
	HPV-40		740	
<i>Human papillomavirus</i>	HPV-58	FAP59/FAP64	264	Forslund et al., 1999
	12Novos tipos HPVs		434,437, 440, 446	
<i>Bovine papillomavirus</i>	11Novos tipos BPVs	FAP59/FAP64	405, 407, 408, 410, 411, 413, 414, 416	Ogawa et al., 2004
<i>Trichechus manatus latirostris papillomavirus</i>	TmIPV	MY09/MY11	458	Woodruff et al., 2005
<i>Koala papillomavirus</i>	KoPV	FAP59/FAP/64	440	Antonsson e Mc Millan, 2006
<i>Ursus maritimus papillomavirus 1</i>	UmPV-1	RCA	500, 700, 1.500, 2.300, 2.600	Stevens et al., 2008
<i>Canine oral papillomavirus</i>	COPV		<1.000	Nicholls et al., 1999

Em equinos, os papilomas apresentam-se disseminados, principalmente na cabeça, focinho, lábios e conjuntiva. Entretanto, podem ocorrer em outras partes do corpo, como pênis, vulva, glândulas mamárias e membros (BLOOD e RADOSTITS, 1991; YAGER e SCOTT, 1991; EVANS, 1994; KNOTTENBELT e PASCOE, 1998; MURPHY et al., 1999; WITTMANN, 1999; MERCK, 2001; WHITE et al., 2004).

As lesões papilomatosas em equinos podem ser solitárias ou múltiplas (YAGER e SCOTT, 1991; EVANS, 1994; KNOTTENBELT e PASCOE, 1998), e raramente chegam a causar sérios problemas (BLOOD e RADOSTITS, 1991; EVANS, 1994). Geralmente, apresentam-se pequenas, não excedendo a 1 cm de diâmetro (BLOOD e RADOSTITS, 1991; EVANS, 1994; KNOTTENBELT e PASCOE, 1998). Podem ser elevadas, pedunculadas e queratinizadas (MURPHY et al., 1999; WHITE et al., 2004). Têm consistência firme, coloração branca a brônzea, superfície lisa ou rugosa e em formato de “couve-flor” (EVANS, 1994; WHITE et al., 2004). Há também uma forma achatada de papilomas em equinos, conhecida como placas aurais, que ainda possui etiologia desconhecida (MERCK, 2001).

Knottenbelt e Pascoe (1998) a descrevem como uma forma clinicamente distinta da papilomatose equina, entretanto, Evans (1994) evidencia que sua etiologia pode ser um PV equino atípico. As placas aurais apresentam-se no pavilhão auricular de equinos, principalmente na parte interna. Esta condição é comum a ambos os sexos e a todas as raças e idades (WHITE et al., 2004). Estas lesões se iniciam como pequenas papilas despigmentadas e lisas que progridem até placas ou crostas queratinosas (hiperqueratóticas) grandes e cinza, abrangendo extensas áreas na superfície interna da pina (KNOTTENBELT e PASCOE, 1998). Estes são papilomas que não regridem espontaneamente (WHITE et al., 2004), porém, exercem pouco ou nenhum efeito danoso ou desconfortável ao animal, apesar de poderem se transformar em formações de aspecto desagradável (KNOTTENBELT e PASCOE, 1998).

Dentre as características histológicas das lesões papilomatosas em equinos, encontra-se a hiperplasia uniforme das papilas epidermais com marcada expansão do estrato espinhoso. Os papilomas são suportados por estroma fibrovascular, sem evidência de proliferação fibroblástica da derme. Superfície hiperqueratótica é comum e pode ocorrer vacuolização variável de queratinócitos em todos os estratos. No epitélio basal, o pigmento de melanina varia de pouco a intenso (WHITE et al., 2004). A hiperplasia da epiderme é marcadamente irregular, com queratinócitos

atípicos, conhecidos como quoilócitos. Estes queratinócitos alterados são característicos da infecção pelo PV (WHITE et al., 2004).

### 3.11.2. Sinais clínicos e lesões da virose em animais silvestres

Partículas virais, típicas da família *Papillomaviridae*, foram demonstradas pela microscopia eletrônica e pelo exame histopatológico em amostras de girafa e de impala. Histologicamente, os tecidos provaram ser típicos de papilomas. As partículas virais mediam 38 nm e 40 nm de diâmetro em todas as secções de tecidos do impala e da girafa, respectivamente (KARSTAD e KAMINJOLO, 1978, p. 311). Clinicamente, pequenos papilomas foram encontrados no pé de um impala (*Aepyceros melampus*) e na cabeça de uma girafa (*Giraffa camelopardalis*) no Kenya, África (KARSTAD e KAMINJOLO, 1978, p. 309).

Em macacos, achados clínicos e patológicos sugerem infecção positiva contendo DNA RhPV-1 integrado ao DNA da célula tumoral, confirmado pelas técnicas de hibridização. Evidências histopatológicas da infecção pelo RhPV-1 mostraram um aumento proporcional das células basais e parabasais, a presença de quoilócitos e células ocasionais com núcleo atípico ampliado. Secções histológicas de biópsias cervicais também revelaram características do PV associado à neoplasia, incluindo quoilócitos, perda de maturação, núcleo atípico, aumento da atividade mitótica e, ocasionalmente, notou-se carcinoma das células escamosas, bem diferenciado e focalmente invasivo. No exame *post-mortem*, é possível detectar carcinoma adenoescamoso no endocérvix (OSTROW et al., 1990).

Nas aves, as verrugas de PV têm sido descritas em duas espécies de pássaros tentilhões estritamente relacionadas, o *chaffinch* (*Fringilla coelebs*) e o *bramling* (*Fringilla montifringilla*), e comportam-se como PV altamente espécie-específico e causador de lesões benignas e malignas no epitélio da mucosa (MORENO-LOPEZ et al., 1984, p. 872; TERAJ et al., 2002, p. 10020). A infecção pelo PV entre as espécies de pássaros foi diagnosticada como lesões de papilomas escamosos na pata de tentilhão (*Fringilla coelebs papillomavirus* – FPV) e no papagaio cinza africano (*Psittacus erithacus timneh papillomavirus* – PePV) (TERAJ et al., 2002, p. 10020).

Hiperplasia oral focal foi diagnosticada histologicamente em amostras de lesões localizadas na superfície ventral da língua, em leões asiáticos (*Panthera leo persica*) de vida livre e de cativeiro. Antígenos específicos para o grupo do PV foram detectados pela imunohistoquímica, e partículas virais intranucleares foram observadas pela microscopia eletrônica (SUNDBERG et al., 1996, p.61). Pela técnica de Southern blot utilizando endonuclease de restrição *Bam HI*, foi detectado um fragmento de DNA de 8.000 bp. Esse novo papilomavírus, diferente das lesões cutâneas de felinos domésticos, foi identificado como PIPV, a partir da biópsia em amostra oral (SUNDBERG et al., 1996, p.64).

### **3.12. Resposta imune à infecção viral**

A produção de anticorpos neutralizantes pode ocorrer durante a regressão espontânea da maioria das lesões induzidas pelos PVs. Além disso, estes anticorpos podem prevenir contra uma reinfecção pelo PV. Dessa forma, o estudo dos anticorpos neutralizantes pode propiciar a base para testes sorológicos que indicam uma infecção prévia e uma proteção contra o tipo-específico de PV (GHIM et al., 2000).

A importância da resposta imune do hospedeiro no controle da infecção pelo PV é demonstrada em indivíduos imunocomprometidos ou pela imunossupressão terapêutica (NICHOLLS et al., 1999, p. 365). A imunidade celular na papilomatose é importante para estabelecer quais proteínas virais podem ser efetivas na produção de vacinas terapêuticas e para desenvolver estratégias vacinais para indução de imunidade celular contra diferentes tipos de PV (NICHOLLS et al., 1999, p. 365).

Em caninos, em amostras da mucosa oral, colhidas após a regressão espontânea das lesões, foram detectadas sequências do DNA do COPV, pela técnica de PCR, sugerindo que o COPV pode entrar em estado de latência, como ocorre nas infecções provocadas pelo PV nas outras espécies animais (NICHOLLS et al., 2001). A papilomatose tem sido observada em cães com hipogamaglobulinemia e há registros de múltiplos papilomas associados à deficiência de IgM, prejudiciais às respostas de células T (NICHOLLS et al., 1999, p. 369). A importância dos anticorpos para prevenção de papilomas induzidos pelo COPV foi demonstrada experimentalmente na transferência passiva. Sabe-se que a

ativação do sistema de defesa do hospedeiro ocorre de forma tardia, logo, o desenvolvimento da imunidade humoral pode não esclarecer as infecções pelo COPV estabelecidas e nem a prevenção de infecções recorrentes (NICHOLLS et al., 1999, p. 370).

Por outro lado, o resultado da transferência passiva indica que a resposta do sistema imune humoral é suficiente para prevenção da formação do papiloma (SUZICH et al., 1995). Os cães desmamados são protegidos por meio da transferência passiva de imunoglobulinas, uma vez que os anticorpos IgG de cães *Beagles* regressores foram reativos pelo ELISA e conferiram proteção contra o desafio da infecção pelo COPV (GHIM et al., 2000). Os *Beagles* regressores não desenvolveram novos papilomas orais após a 11ª semana pós-inoculação do vírus, devido ao tipo-específico do COPV, à imunidade celular-mediada, aos anticorpos neutralizantes ou à interação desses fatores (GHIM et al., 2000). Em cães infectados simultaneamente por mais de um tipo de PV, a regressão espontânea ocorre entre os papilomas induzidos pelo mesmo tipo de PV, sugerindo um PV tipo-específico (GHIM et al., 2000). Esta regressão espontânea está geralmente associada a linfócitos que infiltram e destroem as células basais infectadas, portanto, considera-se imunidade celular-mediada (GHIM et al., 2000).

Estudos moleculares durante a regressão dos papilomas revelaram infiltrados de linfócitos com abundantes células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (NICHOLLS et al., 2001, p. 32). O infiltrado inflamatório na regressão das lesões pelo COPV com numerosas células CD4<sup>+</sup> sugere que estas desempenhem uma função chave, talvez com células T *helper* 1 (Th1) CD4<sup>+</sup> para ativação de macrófagos, inibição da citocina-mediada (células CD1<sup>+</sup>, CD11a<sup>c+</sup> e CD21<sup>+</sup>) ou eliminação dos queratinócitos infectados (NICHOLLS et al., 2001, p. 36).

Na espécie felina, a infecção pelo PV geralmente se dá em decorrência da queda do sistema imunológico por diversos fatores, como por exemplo, a co-infecção pelo vírus da imunodeficiência felina (*Feline immunodeficiency virus* – FIV) (SUNDBERG et al., 2000).

Trabalhos prévios em bovinos, coelhos e humanos têm demonstrado que o aumento de linfócitos na regressão dos papilomas é proporcional ao crescimento dos mesmos (NICHOLLS et al., 2001, p. 36). A imunidade celular pela administração da vacina DNA contra o papilomavírus tem sido empregada em coelhos como modelo de estudo da imunologia viral (HU et al., 2006). A proteína do capsídeo viral

L1 tem sido usada com sucesso como antígeno para estimular uma resposta celular protetora contra as células infectadas pelo vírus, mediante a produção de anticorpos neutralizantes anti-L1. Entretanto, uma falha vacinal é possível em razão do DNA viral poder ultrapassar a imunidade celular protetora, induzindo a formação de papilomas em modelos experimentais de coelhos do grupo-controle e do grupo-teste (HU et al., 2006, p. 493). Recentemente, outro estudo experimental buscou elucidar questões sobre a regressão espontânea dos papilomas, imunizando coelhos consanguíneos com tipos selvagens dos genes E5 e E6. A vacinação com gene E5 falhou na proteção contra o desafio viral, e conclui-se que a transformação de um único aminoácido G312E na proteína E6 do CRPV aumentou a proteção contra as infecções de CRPV tipo selvagem (HU et al., 2007). Contudo, as pesquisas em humanos têm demonstrado que a indução de células T citotóxicas (CTLs) vem sendo um dos mecanismos de defesa contra infecções virais e está diretamente associada ao controle das lesões. Verificou-se que a maioria das células inflamatórias presentes no estroma, epitélio da camada basal eram os linfócitos TCD4, enquanto os linfócitos TCD8 estavam presentes em menor grau (FERNANDES, 2003, p.61; NICOL, 2004, p.59).

Durante a infecção viral, dano ao DNA ou em situações de stress celular, a proteína p53, gene supressor tumoral, é ativada e interrompe o ciclo celular para reparar os danos causados. A p53 em altos níveis recruta proteínas que atuam como marcadores da atividade celular envolvidas na morte celular que são expressas em lesões de mulheres infectadas pelo HPV. Sendo assim, a p53 pode aumentar a expressão da proteína p21, estimular a expressão da proteína pró-apoptótica Bax e inibir a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2, induzindo a célula a entrar em apoptose. Porém, em lesões associadas ao HPV, e de forma expressiva no câncer do colo do útero, na tentativa de frear a replicação viral, ocorre um aumento da infiltração de macrófagos, e a p53 é inibida pela proteína codificada do gene E6 na célula infectada. Outrossim, o vírus poderá regular a expressão dessas proteínas Bax e Bcl-2, inibindo assim a apoptose e induzindo a proliferação descontrolada das células, avançando para o processo de oncogênese viral (FERNANDES, 2003, p. 53; NICOL, 2004, p. 59).

Sabe-se que os complexos formados pelas proteínas E6-p53 e E7-pRB são degradados e apresentados pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade maior de classe I (MHC I), na superfície celular às CTLs. A p53 pode estimular a

expressão de Bax e inibir a expressão de Bcl2 e, como a p53 é inibida pelo HPV, este poderá regular a expressão de ambos marcadores e, assim, inibir a apoptose (FERNANDES, 2003, p. 18; NICOL, 2004, p. 17).

### 3.13. Cofatores

Estudos em bovinos sustentam a hipótese de que a imunossupressão, como consequência da ingestão da samambaia do campo (*Pteridium aquilinum v. arachnoideum*) ou do tratamento com azathioprina, acentua de forma negativa a associação com a infecção pelo PV, por meio da extensão das lesões para o esôfago e trato ruminal, não induzindo sinais de regressão (NICHOLLS et al., 1999).

A samambaia do campo possui substâncias cancerígenas que, quando ingeridas, induzem a transformação de papilomas bovinos vesicais benignos para carcinoma de células escamosas na bexiga (ONIONS, 1997; MURPHY et al., 1999), e, posteriormente, desenvolve-se um quadro clínico de hematúria enzoótica bovina (WOSIACKI et al., 2003).

Em humanos, a frequência de aberrações cromossômicas estruturais em linfócitos do sangue periférico, de consumidores da samambaia do campo e não consumidores, tem sido analisada. Além dos hábitos alimentares, outros cofatores, como tabagismo, ingestão de álcool e faixa etária, também foram considerados na pesquisa (RECOUSO et al., 2003, p. 3). Dentre as substâncias presentes na planta, destaca-se o flavonoide quercetina (5, 7,3', 4'- tetrahydroxyflavona), encontrada em altos níveis na samambaia do campo, com efeito imunossupressor e carcinogênico, capaz de induzir anomalias cromossômicas específicas (LEAL et al., 2003, p. 16).

### 3.14. Diagnóstico

O diagnóstico da papilomatose não apresenta dificuldades, uma vez que a expressão clínica da doença e os dados epidemiológicos costumam ser típicos. A simples observação dos papilomas a olho nu torna o diagnóstico clínico fácil (WITTMANN, 1999; ROMANOS et al., 2002). Entretanto, se os sinais clínicos não forem patognomônicos, a biópsia excisional, para a realização de exames



laboratoriais sugestivos e confirmatórios, é indicada (REBHUN, 2000). Entretanto, o maior impedimento no avanço da descoberta e caracterização genômica do papilomavírus, a partir de amostras teciduais, é a ausência de um sistema de cultura de células convencional para a propagação viral *in vitro* (RECTOR et al., 2004, p. 12698). A presença do PV pode ser comprovada por testes laboratoriais que podem revelar a presença de alterações celulares, as quais podem ser sugestivas da infecção pelo PV. Por outro lado, a infecção pode ocorrer sem alteração citopatológica, sendo importante, dessa forma, a combinação de testes. Entre os testes sugestivos e confirmatórios importantes, para o diagnóstico de infecção pelo PV, destacam-se a citopatologia, a histopatologia, a imunohistoquímica, a microscopia eletrônica e os testes para detecção do ácido nucléico viral (MAYR e GUERREIRO, 1988; BLOCH et al., HAYWARD et al., 1993; 1997; MURPHY et al., 1999; ROMANOS et al., 2002).

O exame citopatológico identifica tanto as alterações celulares benignas, como aquelas de maior gravidade. Já os critérios histopatológicos permitem o diagnóstico de infecções por PV, mas não identificam o tipo viral envolvido. Entretanto, segundo Appel (1987), a histopatologia pode diferenciar o caráter benigno dos papilomas da malignidade de tumores invasivos (APPEL, 1987; ROMANOS et al., 2002). Partículas de PV podem ser detectadas pelo *screening* imunohistoquímico, em pesquisa de antígenos específicos dos capsídeos do PV. O teste imunohistoquímico emprega sistemas como o complexo avidina-biotina (ABC) (SUNDBERG et al., 2000). A microscopia eletrônica de transmissão revela a presença de partículas virais intranucleares. Contudo, tal procedimento é pouco utilizado na rotina de diagnóstico das lesões (ROMANOS et al., 2002). À microscopia eletrônica, evidenciou-se o acúmulo de PV em um arranjo cristalino na camada granular da epiderme, mostrando em abundância partículas virais características, algumas vezes com áreas inflamatórias em nível celular, como resposta à rejeição do tumor pelo hospedeiro (HAYWARD et al., 2003).

Constatou-se, ao microscópio eletrônico, que as verrugas contêm uma concentração mais elevada de partículas virais quando possuem cerca de seis meses (JAWETZ et al., 1984). Entretanto, Blood e Radostiis (1991) afirmaram que o vírus está presente em maior concentração no tecido epitelial de verrugas mais velhas do que nas jovens (BLOOD e RADOSTIIS, 1991). Com relação aos testes para detecção do ácido nucléico viral, além de detectar a infecção pelo PV, de

acordo com o método empregado, são mais sensíveis para determinar o tipo ou a cepa viral envolvida. Podem ser empregadas as técnicas de *Southern blotting*, hibridização *in situ* e reação em cadeia da polimerase (PCR) (SIRONI et al., 1990; BLOCH et al., 1997; MURPHY et al., 1999; ROMANOS et al., 2002; CARVALHO et al., 2003 a, b).

### 3.15. Medidas preventivas

Dentre as medidas preventivas adotadas para os animais domésticos, estão: nunca comprar ou aceitar animais com papilomatose; isolar os animais doentes e tratá-los imediatamente; ordenhar os animais acometidos pela doença por último (proceder a “linha de ordenha”); fazer rigorosa assepsia no equipamento de ordenha mecânica ou evitar o uso das ordenhadeiras; ao constatar verrugas, iniciar o tratamento o mais rápido possível; dar atenção especial aos animais recém-nascidos; persistir no tratamento até sanar o problema; descartar gradativamente os animais que não responderem a nenhum tipo de tratamento (MAYR e GUERREIRO, 1988, p. 467).

A desinfecção das instalações dos animais e a esterilização dos materiais empregados nas manobras de rotina destes constituem medidas importantes para prevenir e controlar a papilomatose. Deve-se desinfetar as instalações com soda cáustica ou formol a 2%. Deve-se dedicar atenção especial à esterilização dos materiais empregados na vacinação, na tuberculinização e na castração. Em adição, o controle de carrapatos e moscas hematófagas, possíveis vetores mecânicos na transmissão da virose, deve ser considerado (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 712).

A vacinação profilática também é uma medida importante que pode ser adotada. Devem-se vacinar os animais sãos, por via subcutânea, em duas a três aplicações separadas por um intervalo de 14 dias, nas doses indicadas pelo fabricante. Quanto à resposta vacinal, demonstrou-se que, entre seis e oito meses após a vacinação profilática, a ocorrência da doença é muito rara e, quando ocorre, a evolução é mais branda (WITTAMNN, 1999, p. 260).

### 3.16. Tratamento

As infecções persistentes provocadas pelo PV em alguns indivíduos, provavelmente são insensíveis à vacinação terapêutica. Necessita-se de um bom conhecimento sobre a biologia da doença associada ao PV específico para o desenvolvimento de terapias não-imunológicas. Pela raridade de achados clínicos e epidemiológicos em felídeos, as formas de tratamento baseiam-se nos estudos voltados para as mais diversas vacinas que utilizam a espécie canina como modelo primário em fase de testes (NICHOLLS et al., 1997; NICHOLLS et al., 1999).

Com base em terapias convencionais para o tratamento da infecção pelo PV, pode-se preconizar a remoção cirúrgica de papilomas quando em números reduzidos ou pode ser realizada a preparação de vacina autógena inativada, a partir da retirada de amostras papilomatosas oriundas de cada espécie. Em razão da existência de poucas citações na literatura sobre métodos profiláticos e curativos nas espécies de animais de médio porte, pouco se sabe a respeito do tratamento nestas espécies (caprina, ovina e suína). Diversos tratamentos de eficácias variáveis têm sido utilizados, e resultados contraditórios e deficientes têm sido obtidos (CORRÊA e CORRÊA, 1992; STURION et al., 1997).

Devido à carência de especificidade, em muitos casos, é necessária a repetição do tratamento por várias vezes. Dentre os tratamentos que não são específicos e constantes em seus resultados estão: alternativas caseiras, tratamentos químico-corrosivos, homeopáticos, fitoterápicos e empírico-científicos (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 712; STURION et al., 1997; NICHOLLS et al., 1999).

As alternativas caseiras, sem fundamentação científica, tais como: simpatias, benzer os animais, furar orelha com ferro quente, amarrar corrente no pescoço, uso de querosene na nuca do animal e sal mineral nos papilomas, fazem com que as lesões desapareçam naturalmente. Isso porque o próprio papiloma induz a imunidade humoral e citomediada. A cauterização com ácido sulfúrico, tintura de iodo, soda cáustica, nitrato de prata e bastão de soda são exemplos de tratamentos químico-corrosivos que podem causar reabsorção de tecido rico em vírus e trazer a cura secundária, pelo estímulo desencadeado, aos animais imunocompetentes e imunologicamente maduros.

Os mesmos fenômenos são desencadeados na utilização de tratamentos homeopáticos e fitoterápicos, como, por exemplo, o uso de *Thuya occidentalis*

(vulgarmente, “tuia”) ou de *Euphorbia tirucallis* (vulgarmente, “aveloz” ou “mata-verrugas”). Já no tratamento empírico-científico, utiliza-se a remoção do papiloma por tração, ou seja, ligadura da verruga pedunculada com fio de seda ou crina de cavalo, para causar gangrena seca e reabsorção do coto (BLOOD e RADOSTITS, 1991; CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 712).

Os métodos de tratamento com fundamentação científica que têm sido preconizados são: vacinas com partículas vírus-semelhantes (VLPs) (GHIM et al., 2000), genes iniciais E1 e E2 e tardios L1 e L2 (SUZICH et al., 1995; CHEN et al., 1998; MOORE et al., 2003); vacina autógena profilática, a partir de extratos de verrugas de COPV inativado com formalina, e administrada com adjuvante, para prevenção do desenvolvimento de papilomas (NICHOLLS e STANLEY, 1999), ou uso da autovaccina como método terapêutico em bovinos (WADHWA et al., 1995.; STURION et al., 1997.; SILVA et al., 1998.; WITTMANN, 1999, p. 260.; EISA et al., 2000.; FREITAS et al., 2003; ZANINI et al., 2003, p. 219.; MARINS et al., 2005, p. 130) e aplicação da vacina autógena em equinos (BLOOD e RADOSTITS, 1991; EVANS, 1994).

Também são utilizados imunomoduladores no tratamento da papilomatose, com a capacidade de aumentar a resistência do hospedeiro a certos tumores, mediante, principalmente, a produção de interferon e seus indutores (MEGID et al., 2001). A remoção cirúrgica é considerada o método terapêutico mais seguro (WITTMANN, 1999, p. 260), e os autores, Blood e Radostits, 1991; Desrochers et al. 1994; Sturion et al. 1997; Silva et al., 1998, p. 84; Wittmann, 1999, p. 260 e Marins, 2004, citam o tratamento cirúrgico para a papilomatose, principalmente quando são poucos os papilomas. A eficácia da remoção cirúrgica foi confirmada em experimentos com bovinos, que demonstraram ótima resposta ao tratamento, sem recorrência de tumores (DESROCHERS et al., 1994; GORDON, 1997; EISA et al., 2000).

A auto-hemoterapia pode ser associada ao clorobutanol ou ao babesicida, para a obtenção de melhores resultados, por ser um método terapêutico eficaz, simples e de baixo custo (SILVA et al., 1998, p. 86). O sucesso do tratamento por meio do implante de papiloma na região axilar baseia-se na quantidade de carga viral presente no papiloma no momento do implante, suficiente para induzir resposta imunológica no animal pelo contato com a vascularização subcutânea (STURION et al., 1997, p. 52; SILVA et al., 1998, p. 86).

O antimonial, com preparações de eficácias variáveis no tratamento da papilomatose bovina, tem sido utilizado (WADHWA et al., 1995, p. 97; WADHWA et al., 1996, p. 207) e têm sido preconizadas terapias não-convencionais, como a homeopatia e fitoterapia no tratamento da papilomatose cutânea bovina com dinamizações da *Thuya occidentalis* (MARINS et al., 2006, p.11). O uso do babesicida induz resposta após três meses de sua aplicação (CORRÊA e CORRÊA, 1992, p. 712), e os tratamentos tópicos, que incluem a cauterização dos papilomas com ácido tricloroacético (TCA) ou com tintura de ácido salicílico a 20%, também têm levado a bons resultados (BLOOD e RADOSTITS, 1991).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Distribuição geográfica e procedência das espécies animais**

Para a pesquisa do papilomavírus (PV), foram selecionados, aleatoriamente, animais domésticos e silvestres provenientes das seguintes regiões: Norte, Noroeste e Sul do estado do Rio de Janeiro, Sul do estado do Espírito Santo e Pantanal Sul Mato-grossense do estado do Mato Grosso do Sul. Dentre as espécies animal selecionadas, estavam: bovinos, bubalinos, equinos, ovinos, caninos, felinos, suínos, aves e primatas. Cada animal foi submetido ao exame clínico e à anamnese, antes da colheita de material biológico.

### **4.2. Locais de execução dos experimentos**

Os experimentos foram desenvolvidos em diferentes locais/laboratórios, por meio de colaborações/parcerias estabelecidas com instituições especializadas e necessárias à realização desta tese, cujo caráter foi multidisciplinar. Para tanto, tais metodologias exigiram laboratórios altamente equipados e com pessoal devidamente treinado. A análise molecular das amostras foi realizada no Laboratório de Genética do Instituto Butantan de São Paulo (IBu-SP). Parte das amostras selecionadas foi analisada no Setor de Sequenciamento de DNA, do Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) da Universidade de São Paulo (USP). O processamento citogenético e a análise das amostras sanguíneas e teciduais foram realizados no Laboratório de Citogenética Animal, Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal Fluminense (UFF). As amostras neoplásicas foram processadas e analisadas no Setor de Morfologia e Anatomia Patológica, Laboratório de Sanidade Animal, Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

### **4.3. Colheita de amostras**

#### **4.3.1. Amostras de lesões epiteliais**

Foram colhidas amostras de lesões da pele e/ou mucosa, clinicamente indicativas da infecção pelo PV, nas espécies animais selecionadas. Após a identificação de cada animal e seu estabelecimento de origem, os dados foram documentados em fichas de registro (vide em Anexos), e cada lesão foi examinada quanto à sua forma, dimensão e localização corpórea. Foi feita a assepsia no local da lesão com álcool iodado e/ou absoluto (nos tecidos colhidos para análise citogenética), e procedeu-se à remoção cirúrgica da lesão com uso de bisturi estéril. Cada material colhido foi encaminhado ao laboratório especializado, conservado em maleta térmica refrigerada e acompanhado pelos respectivos documentos de registros do animal e do estabelecimento de origem.

#### **4.3.2. Amostras de sangue total**

Foram colhidas amostras de sangue total com uso de tubos *vacutainer*, contendo o anticoagulante ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid* – EDTA) e 31.000 unidades internacionais (UI) de heparina sódica, por meio de punção da veia jugular dos animais sintomáticos ou assintomáticos. Cada amostra colhida foi devidamente encaminhada ao laboratório especializado (conservada em isopor com gelo e acompanhada dos respectivos documentos de registros). Nos laboratórios, as amostras em um volume de 5 mL foram armazenadas em freezer a -20°C para procedimento molecular e, para análise citogenética, foram processadas imediatamente após a chegada ao laboratório e posteriormente conservadas a -20°C.

### 4.3.3. Animais

#### 4.3.3.1. Estudo da infecção viral assintomática

##### 4.3.3.1.1. Animais domésticos

##### 4.3.3.1.1.1. Bovinos

O local de interesse para estudo dos bovinos portadores assintomáticos da infecção pelo papilomavírus foi a propriedade “Santa Maria do Norte”, situada na localidade conhecida como Morro do Coco, no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro. Os animais eram criados em sistema semi-intensivo. A propriedade destinava-se à atividade pecuária leiteira e mantinha todo o controle sanitário e zootécnico do rebanho, por meio de vermifugação periódica e vacinação. Os bovinos selecionados foram colocados no brete de cotenção e submetidos à assepsia para o procedimento da colheita sanguínea, pela veia jugular e/ou veia mamária, com uso de tubos *vacutainer* contendo anticoagulante EDTA (Tabela 9).

Tabela 9. Dados dos animais da espécie *Bos taurus* no estudo da infecção viral assintomática.

Identificação	Nome/Número	Sexo	Raça	Idade (anos)
Bovino 01	Camila	F	Holandesa	6
Bovino 02	Dolores	F	Holandesa	4
Bovino 03	Padoana	F	Girolanda	4
Bovino 04	Jurema	F	Pardo Suíço	10
Bovino 05	062	F	Holandesa	5
Bovino 06	Madame	F	Mestiço	6
Bovino 07	Duquesa	F	Mestiço	3
Bovino 08	Beleza	F	Mestiço	3
Bovino 09	Toalha	F	Mestiço	3
Bovino 10	Cassandra	F	Mestiço	5



#### 4.3.3.1.1.2. Bubalinos

As amostras de bubalinos foram obtidas na fazenda “Sítio Cruzeiro” localizada no município de Presidente Kennedy, estado do Espírito Santo. A fazenda era dedicada exclusivamente à criação de bubalinos mestiços para corte. Os animais eram criados em sistema extensivo, vacinados contra febre aftosa e vermifugados periodicamente. Para a colheita de sangue, os animais foram encaminhados ao tronco de contenção e cerca de 1 mL de sangue foi colhido de veias periféricas na orelha, com uso de seringa descartável, e transferido para tubo contendo heparina. As amostras foram transportadas ao laboratório e, em seguida, centrifugadas a 3.200 rpm por 10 minutos. Amostras de plasma foram acondicionadas a -70°C e pertenciam ao total de 12 bubalinos da espécie *Bubalus bubalis* (Tabela 10).

Tabela 10. Dados dos animais da espécie *Bubalus bubalis* no estudo da infecção viral assintomática

Identificação	Número	Sexo	Idade/Nasc.	Colheita
Búfalo 01	62	F	5 anos	23/11/04
Búfalo 02	59	F	12 meses	23/11/04
Búfalo 03	10	F	6 anos	23/11/04
Búfalo 04	03	F	10 meses	01/03/05
Búfalo 05	18	F	6 anos	01/03/05
Búfalo 06	077	F	10 meses	01/03/05
Búfalo 07	53	M	10 meses	01/03/05
Búfalo 08	32	F	5 anos	09/03/05
Búfalo 09	78	F	4 anos	09/03/05
Búfalo 10	51	M	10 meses	01/03/05
Búfalo 11	074	F	11 meses	09/03/05
Búfalo 12	54	M	6 meses	19/10/04

#### 4.3.3.1.1.3. Equinos

As amostras sanguíneas de equinos foram obtidas na “Vila Taterssal”, Jockey Club Brasileiro, na cidade do Rio de Janeiro, estado do RJ. Os animais eram destinados ao treinamento de corridas de curtas e longas distâncias em pistas gramadas ou não, e mantinham dieta regular com ração, alfafa e cenoura ralada. Exerciam periodicamente atividades cardiorrespiratórias e locomotoras, como caminhadas, natação e treinos. Eram vacinados e vermifugados, e estavam alojados em baias individuais, algumas sob sistema de refrigeração. No total, foram selecionados 12 equinos da espécie *Equus caballus*, sete machos e cinco fêmeas, todos da raça “Puro Sangue Inglês” (PSI), com idades entre dois e quatro anos (Tabela 11).

Tabela 11. Dados dos animais da espécie *Equus caballus* no estudo da infecção viral assintomática

Identificação	Nome	Sexo	Raça	Idade (anos)	Colheita
Equino 01	Superdude	M	PSI	2	30/03/07
Equino 02	Jacumeça	F	PSI	4	30/03/07
Equino 03	Leão Fustão	M	PSI	2	30/03/07
Equino 04	Fantástico Riso	M	PSI	4	30/03/07
Equino 05	Porto Iguassu	M	PSI	2	30/03/07
Equino 06	Calabrez	M	PSI	4	30/03/07
Equino 07	Pontonela	F	PSI	2	30/03/07
Equino 08	Dores e Belles	F	PSI	2	30/03/07
Equino 09	Zabalena	F	PSI	4	30/03/07
Equino 10	Belo Brunel	M	PSI	2	30/03/07
Equino 11	Núcio	M	PSI	2	30/03/07
Equino 12	Danzitopz	F	PSI	2	30/03/07

#### 4.3.3.1.1.4. Ovinos

As amostras de ovinos foram obtidas na propriedade “Santa Maria do Norte II”, na localidade de Pedra Santa, município de São Francisco do Itabapoana, na divisa com Campos dos Goytacazes, região Norte Fluminense. A propriedade destinava-se à criação de ovinos deslanados com manejo rotacionado em piquetes. Os animais foram selecionados e contidos individualmente para a colheita de sangue pela veia jugular, com uso de agulha e seringa descartáveis ou tubos *vacutainer* contendo anticoagulante específico. Todos os ovinos envolvidos no estudo foram fêmeas, mestiças, com idade entre um e cinco anos (Tabela 12).

Tabela 12. Dados dos animais da espécie *Ovis aries* no estudo da infecção viral assintomática

Identificação	Local	Sexo	Raça	Idade (anos)	Colheita
Ovino 01	Campos	F	Mestiço	4	02/04/07
Ovino 02	Campos	F	Mestiço	1	02/04/07
Ovino 03	Campos	F	Mestiço	3	02/04/07
Ovino 04	Campos	F	Mestiço	5	02/04/07
Ovino 05	Campos	F	Mestiço	4	02/04/07
Ovino 06	Campos	F	Mestiço	1	02/04/07
Ovino 07	Campos	F	Mestiço	3	02/04/07
Ovino 08	Campos	F	Mestiço	4	02/04/07
Ovino 09	São F <sup>co</sup> de Itabapoana	F	Mestiço	3	02/04/07
Ovino 10	São F <sup>co</sup> de Itabapoana	F	Mestiço	3	02/04/07

#### 4.3.3.1.1.5. Suínos

As amostras de suínos foram obtidas no “Modelo de Fazenda” da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes–RJ. Os animais foram contidos individualmente e submetidos à colheita sanguínea na região auricular ou pela veia femoral, com uso de seringa descartável

rinsada com anticoagulante ou com agulhas apropriadas para tubos *vacutainer*. Foram selecionados seis suínos da espécie *Sus domesticus*, três machos e três fêmeas, com dois meses de idade, oriundos do cruzamento das raças Landrace com Large White (Tabela 13).

Tabela 13. Dados dos animais da espécie *Sus domesticus* no estudo da infecção viral assintomática

Identificação	Nome/Número	Sexo	Raça	Idade	Colheita
Suíno 01	Fazenda UENF	F	Landrace x Large White	2 meses	05/02/07
Suíno 02	Fazenda UENF	M	Landrace x Large White	2 meses	05/02/07
Suíno 03	Fazenda UENF	M	Landrace x Large White	2 meses	05/02/07
Suíno 04	Fazenda UENF	F	Landrace x Large White	2 meses	05/02/07
Suíno 05	Fazenda UENF	M	Landrace x Large White	2 meses	05/02/07
Suíno 06	Fazenda UENF	F	Landrace x Large White	2 meses	05/02/07

#### 4.3.3.1.1.6. Caninos

Os caninos envolvidos no estudo foram atendidos na clínica de pequenos animais do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (HV–UENF), Campos dos Goytacazes–RJ, e outros atendidos no Laboratório de Análises Clínicas da Região Serrana do Estado. Os animais eram de proprietários particulares, com manejos, históricos e hábitos alimentares diferenciados. Em consultas de rotina, cada animal foi contido e, aproximadamente, 4 mL de sangue total foram colhidos pela veia cefálica, com uso de tubos *vacutainer*, contendo o anticoagulante necessário. Foram estudados dez caninos de espécie *Canis familiaris*, sete fêmeas e três machos, de variadas idades e raças (Tabela 14).

Tabela 14. Dados dos animais da espécie *Canis familiaris* no estudo da infecção viral assintomática

Identificação	Nome/Número	Sexo	Raça	Idade (anos)	Colheita
Canino 01	Angelina	F	SRD	2	10/04/07
Canino 02	Nina	F	Labrador	1	11/04/07
Canino 03	Clara	F	SRD	8	11/04/07
Canino 04	Timão	M	Poodle	8 meses	12/04/07
Canino 05	Princesa	F	SRD	2	12/04/07
Canino 06	Xuxa	F	SRD	6	12/04/07
Canino 07	17283	F	Boxer	5	24/02/07
Canino 08	17273	M	Pastor	10	26/02/07
Canino 09	17294	F	Poodle	6	24/02/07
Canino 10	17291	M	Bloodhound	2	24/02/07

SRD: sem raça definida

#### 4.3.3.1.1.7. Avestruzes

As amostras de avestruzes foram obtidas na fazenda “Estação do Avestruz”, situada no município de Saquarema, na região Sul Fluminense. A propriedade abrangia a criação de 400 avestruzes em uma área de 50 mil m<sup>2</sup>, que disponibilizava infraestrutura de instalações como incubadora de ovos, chocadeira, seleção dos ovos, enfermaria, maternidade, reprodução e venda dos produtos para exportação. Os animais eram divididos por faixa etária em piquetes separados e, semanalmente, eram examinados para verificação dos parâmetros fisiológicos. Os animais recebiam laque de identificação de acordo com a sexagem e eram chipados por meio do sistema de identificação *Animal Tag*, recebendo um número de registro para catalogação dos dados biológicos. Os animais foram contidos mecanicamente, colocando-se capuz para venda dos olhos, e a colheita sanguínea foi realizada na veia bráquio-cefálica (logo abaixo das asas), com uso de seringa heparinizada. Foram selecionados dez avestruzes da espécie *Struthio camelus*, quatro fêmeas e seis machos, todos da raça African Black (Tabela 15).

Tabela 15. Dados dos animais *Struthio camelus* no estudo da infecção viral assintomática

Identificação	Número	Sexo	Raça	Idade/Nasc.
Avestruz 01	213243	F	African Black	17 meses
Avestruz 02	205068	M	African Black	24/10/05
Avestruz 03	226502	M	African Black	07/11/05
Avestruz 04	204742	F	African Black	17/10/05
Avestruz 05	224931	M	African Black	10/10/05
Avestruz 06	206124	F	African Black	07/11/05
Avestruz 07	213210	F	African Black	06/11/05
Avestruz 08	174299	M	African Black	10/10/05
Avestruz 09	174618	M	African Black	24/10/05
Avestruz 10	233169	M	African Black	10/10/05

#### 4.3.3.1.2. Animais silvestres

##### 4.3.3.1.2.1. Suínos

As amostras de suínos foram obtidas na fazenda “Alegria”, situada em na localidade de Nhecolândia, na região Sul do Pantanal Mato-grossense, estado do Mato Grosso do Sul. Os animais foram contidos mecanicamente e submetidos à colheita sanguínea, com uso de tubos *vacutainer* e agulhas apropriadas. Foram selecionados três suínos selvagens (comumente conhecidos como “porco monteiro” ou “javali”) da espécie *Sus scrofa*, adultos e fêmeas (Tabela 16).

Tabela 16. Dados dos animais *Sus scrofa* no estudo da infecção viral assintomática

<b>Identificação</b>	<b>Local</b>	<b>Sexo</b>	<b>Raça</b>	<b>Idade</b>	<b>Colheita</b>
Suíno 01	Pantanal	F	Mestiço	Adulto	14/04/07
Suíno 02	Pantanal	F	Mestiço	Adulto	14/04/07
Suíno 03	Pantanal	F	Mestiço	Adulto	14/04/07

#### 4.3.3.1.2.2. Araras

As amostras de araras foram obtidas na Fundação Jardim Zoológico da Cidade do Rio de Janeiro (RIOZOO), situada na Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro–RJ. A Fundação RIOZOO possui a maior coleção de aves expostas do país. Muitos destes animais são doados e chegam à enfermaria em estado clínico e sanitário precários, necessitando passar pelo período de quarentena, quando eram realizados alguns exames clínicos para controle e sanidade dos animais. Após resultados satisfatórios, os animais eram introduzidos nos viveiros. As araras selecionadas foram “arara Canindé” (*Ara ararauna*), “arara vermelha” (*Ara chloroptera*) e “araracanga” (*Ara macao*), pertencentes à ordem de Psittaciformes e família Psittacidae. Foram capturadas com puçás e contidas mecanicamente para a colheita sanguínea, com uso de seringa de insulina (1 mL) rinsada com o anticoagulante EDTA (Tabela 17).

Tabela 17. Dados dos animais *Ara ararauna*, *Ara macao* e *Ara chloroptera* no estudo da infecção viral assintomática

Identificação	Local	Sexo	Espécie	Idade	Colheita
Arara 01	RIOZOO	?	<i>Ara chloroptera</i>	Adulto	03/04/07
Arara 02	RIOZOO	?	<i>Ara macao</i>	Adulto	03/04/07
Arara 03	RIOZOO	?	<i>Ara ararauna</i>	Adulto	03/04/07
Arara 04	RIOZOO	?	<i>Ara ararauna</i>	Adulto	10/04/07
Arara 05	RIOZOO	?	<i>Ara ararauna</i>	Adulto	10/04/07
Arara 06	RIOZOO	?	<i>Ara ararauna</i>	Adulto	10/04/07
Arara 07	RIOZOO	?	<i>Ara ararauna</i>	Adulto	10/04/07
Arara 08	RIOZOO	?	<i>Ara ararauna</i>	Adulto	10/04/07
Arara 09	RIOZOO	?	<i>Ara ararauna</i>	Adulto	10/04/07
Arara 10	RIOZOO	?	<i>Ara ararauna</i>	Adulto	10/04/07

#### 4.3.3.1.2.3. Onças

As amostras de onças foram obtidas na Unidade de Pesquisa e Educação Ambiental, da Fundação RIOZOO, com uma área de 138 mil metros quadrados, que abriga mais de 2.100 animais silvestres entre répteis, mamíferos e aves, com o objetivo de investir em programas de educação, bem estar animal e pesquisa. Os animais eram submetidos, periodicamente, a exames parasitológicos, bioquímicos, vermifugação, catalogação dos dados biológicos e vacinação, para o controle sanitário local. Os felinos selvagens selecionados foram a onça pintada (*Panthera onca*) e a suçuarana (*Puma concolor* ou *Felis concolor*), ambos pertencentes à ordem Carnivora, família Felidae. Os animais foram sedados quimicamente em recintos individuais e preparados para colheita de sangue, com uso de tubos *vacutainer*. Foram analisados dois felinos adultos, fêmeas, de ambas as espécies (que se encontram ameaçadas de extinção) (Tabela 18).



Tabela 18. Dados dos animais *Panthera onca* e *Felis concolor* no estudo da infecção viral assintomática

Identificação	Nome comum	Local	Sexo	Idade	Colheita
Onça 01	Pintada	RioZoo	F	Adulto	03/04/07
Onça 02	Puma ou Suçuarana	RioZoo	F	Adulto	03/04/07

#### 4.3.3.2. Estudo da infecção viral clínica

##### 4.3.3.2.1. Animais domésticos

###### 4.3.3.2.1.1. Bovinos

O local de interesse para estudo dos bovinos portadores clínicos da infecção pelo papilomavírus, apresentando a papilomatose cutânea, foi a propriedade “Santa Maria do Norte”, situada em Morro do Coco, no município de Campos dos Goytacazes–RJ. A propriedade era destinada à pecuária leiteira e mantinha todo o controle sanitário e zootécnico do rebanho, mediante vermifugação e vacinação. Os bovinos com lesões papilomatosas foram selecionados, colocados no brete de contenção e submetidos à assepsia para procedimento da colheita sanguínea pela veia jugular e/ou veia mamária. O procedimento foi realizado com uso de tubos *vacutainer* contendo anticoagulante EDTA. Paralelamente, os animais foram submetidos à biópsia, pela remoção cirúrgica de fragmento(s) da(s) lesão (ões) ou parte inteira, com uso de bisturi e pinça estéreis, para posterior análise histopatológica. Conforme demonstrado na Tabela 19, seis dos dez animais eram fêmeas e quatro eram machos, apresentavam idade variando entre seis meses e cinco anos, e diversas localizações e morfologias das lesões. Somente um animal era da raça Girolanda, os outros eram meio-sangue Holandês com Pardo-Suíço ou Gir (mestiços) (Tabela 19).

Tabela 19. Dados dos animais *Bos taurus* no estudo da infecção viral clínica

Identificação	Nome	Sexo	Raça	Idade	Forma	Localização
Bovino 01	Dolores	F	Mestiço	5 anos	Plana	Dorso
Bovino 02	Cabrita	F	Mestiço	5 anos	Plana	Membros / Abdômen
Bovino 03	Espanhola	F	Mestiço	9 meses	Plana/ Peduncular	Membros/ Barbela/ Pescoço / Abdômen/ Ventre
Bovino 04	Negão	M	Mestiço	8 meses	Plana	Dorso / Barbela
Bovino 05	Vitória	M	Mestiço	9 meses	Peduncular	Dorso / Barbela
Bovino 06	Chuisca	F	Mestiço	6 meses	Peduncular	Dorso / Pavilhão auricular
Bovino 07	Cabiúma	F	Mestiço	8 meses	Peduncular	Dorso / Pescoço / Barbela
Bovino 08	Morena	F	Mestiço	5 meses	Peduncular	Dorso
Bovino 09	Beleza	M	Mestiço	6 meses	Peduncular	Cabeça / Focinho / Dorso
Bovino 10	Cinco	F	Girolanda	10 meses	Peduncular	Dorso / Pescoço/ Barbela

#### 4.3.3.2.1.2. Equinos

As amostras de equinos foram obtidas em estudos de animais residentes de Haras localizado no município de Petrópolis, estado do Rio de Janeiro. Os animais da raça “Puro Sangue Inglês” (PSI) eram destinados ao esporte do polo e eram mantidos em baias individuais. Anteriormente, tais animais pertenciam ao Jockey Club Brasileiro e exercitavam-se em provas de corridas. Os animais apresentaram lesões planas, características de papilomatose equina. Parte das lesões foi removida e confirmada pela histopatologia como neofomações de papilomas, e os animais foram submetidos ao tratamento com vacina autógena. Realizou-se a colheita de sangue pela veia jugular com tubos *vacutainer* heparinizados. Os equinos envolvidos neste estudo eram fêmeas, de dez anos de idade, da raça PSI, e apresentavam lesões localizadas na região nasolabial e pavilhão auricular (Tabela 20).

Tabela 20. Dados dos animais *Equus caballus* no estudo da infecção viral clínica

Identificação	Nome	Sexo	Raça	Idade	Forma	Localização
Equino 01	Fora de Hora	F	PSI	10 anos	Plana	Lábios / Focinho / Pavilhão auricular
Equino 02	Foguete	F	PSI	10 anos	Plana	Lábios / Focinho / Pavilhão auricular
Equino 03	Itaqui	F	PSI	10 anos	Plana	Lábios / Focinho / Pavilhão auricular

#### 4.3.3.2.1.3. Caninos

Os caninos envolvidos no estudo foram atendidos em clínica veterinária particular da cidade de Niterói, estado do Rio de Janeiro. Os animais eram de proprietários particulares com manejos, históricos e hábitos alimentares diferenciados. Foram estudados dez caninos de espécie *Canis familiaris*, duas fêmeas e quatro machos, de variadas idades e raças. Os cães que apresentavam lesão cutânea suspeita de papilomatose foram encaminhados para a remoção cirúrgica e retirada parcial e/ou total das lesões. O material foi encaminhado para análise histopatológica e cultura das lesões neoplásicas (Tabela 21).

Tabela 21. Dados dos animais *Canis familiaris* no estudo da infecção viral clínica

Identificação	Nome	Sexo	Raça	Idade	Forma	Localização
Canino 01	Zigo	M	Duchound	7 anos	Plana	Focinho
Canino 02	Bella	F	Poodle	9 anos	Plana / Peduncular	Cabeça / Focinho / Olhos / Membros / Dorso / Pescoço / Cauda
Canino 03	Bubby	M	Poodle	11 anos	Plana / Peduncular	Cabeça / Focinho / Olhos / Membros / Dorso / Pescoço / Cauda

#### **4.3.3.2.2. Animais silvestres**

##### **4.3.3.2.2.1. Suíno selvagem**

As amostras de suíno selvagem ou “porco monteiro”, também conhecido como “javali”, da espécie *Sus scrofa*, adulto e fêmea, foram provenientes da Fazenda “Alegria”, na localidade de Nhecolândia, na região Sul do Pantanal Mato-grossense, estado do Mato Grosso do Sul. Procedeu-se à colheita sanguínea em tubos *vacutainer* contendo anticoagulante EDTA e heparina. Paralelamente, procedeu-se à biópsia de parte da lesão e/ou lesão inteira na região do tarso (membro inferior), com uso de bisturi e pinça estéreis, após contenção mecânica do suíno em cativeiro.

##### **4.3.3.2.2.2. Arara**

As amostras de araras, espécie *Ara ararauna* e adulta, foram obtidas no viveiro das araras do Centro de Quarentena da Fundação RIOZOO. O Centro visa à observação dos animais novos (recém-chegados ao zoológico). Neste, são realizados alguns exames clínicos para controle e sanidade dos animais, vermifugação, catalogação dos dados biológicos e vacinação. Procedeu-se à remoção cirúrgica da lesão, com uso de bisturi e pinça estéreis, após contenção química com anestesia inalatória, em uma das araras com lesão na mucosa cloacal.

##### **4.3.3.2.2.3. Leão**

O estudo abrangeu a espécie *Panthera leo*, pertencente à ordem Carnivora, família Felidae, da Fundação RIOZOO. Os animais eram tratados diariamente com alimentação adequada e examinados semestralmente. Durante esse período, um animal foi sedado quimicamente, com uso de dardos anestésicos, para algumas intervenções terapêuticas. Após verificação da presença de lesão similar ao papiloma na mucosa oral, o leão foi sedado com cloridrato de quetamina e xilazina para colheita da amostra tecidual.

#### 4.3.3.2.2.4. Primata

O experimento com primata foi realizado no Departamento de Primatologia (DEPRIM) do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro–RJ. O DEPRIM é o maior criatório de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) destinados à Pesquisa da América Latina. Atualmente, conta com cerca de 400 macacos Rhesus (*Macaca mulatta*), 80 macacos Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) e 50 “micos-de-cheiro” (*Saimiri* sp.). A colônia de macacos Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) está localizada em 10 recintos de 12 m<sup>2</sup>, com ambientes interno e externo. O ambiente interno possui comedouros e maravalha autoclavada em seu piso, e o ambiente externo é dotado de poleiros e bebedouros. O procedimento de manejo visa monitorar o desenvolvimento dos animais e o estado sanitário do plantel. O manejo preventivo é realizado dentro do próprio “gaiolão”, onde os animais são capturados por meio de puçás e, em seguida, são sedados com cloridrato de quetamina (10 mg/kg). Após a sedação, cada animal passa por uma série de análises corporais, exames complementares de rotina, colheita de amostras e tratamentos terapêuticos, quando necessários. De acordo com os procedimentos experimentais, foi realizada a contenção física para a colheita de amostras. Verificou-se, em consulta de rotina, que um dos animais do cativeiro apresentava clinicamente lesão na mucosa oral, suspeita de papiloma. A amostra foi catalogada e extraída após sedação de um primata, da espécie *Macaca fascicularis*, e conservada adequadamente para análise.

Os dados dos animais silvestres envolvidos no estudo da infecção clínica pelo PV encontram-se descritos na Tabela 22.

Tabela 22. Dados dos animais silvestres *Sus scrofa*, *Ara ararauna*, *Panthera leo*, *Macaca fascicularis* no estudo da infecção viral clínica

Identificação	Local	Sexo	Espécie	Idade	Forma	Localização
Suíno 01	Pantanal	F	<i>Sus scrofa</i>	Adulta	Peduncular	Membro inferior
Arara 01	RIOZOO	?	<i>Ara ararauna</i>	Adulta	Peduncular	Mucosa cloacal
Leão 01	RIOZOO	M	<i>Panthera leo</i>	Adulta	Plana	Mucosa oral
Primata 01	FIOCRUZ	M	<i>Macaca fascicularis</i>	15 anos	Plana	Mucosa oral

#### 4.4. Métodos diagnósticos

##### 4.4.1. Análise molecular

##### 4.4.1.1. Extração do DNA total a partir das amostras sanguíneas

Realizou-se a extração do DNA das amostras de diferentes espécies animais, utilizando o *Kit QIAamp DNA blood* (“minikit”), seguindo protocolo do fabricante (QIAGEN). Foram aliqüotados 200 µL de sangue total de cada amostra em tubos de *ependorfs* previamente identificados. Adicionaram-se individualmente, em cada um dos tubos, 20µL de proteinase K e 200 µL de tampão de lise (*Lysis buffer – AL*). Os tubos *ependorfs* foram agitados no vórtex por 15 segundos e incubados a 56°C por 10 minutos a 1.400 rpm no *Thermo Shaker TS-100*.

Após a etapa de incubação, os tubos foram brevemente centrifugados, e adicionaram-se 200 µL de etanol absoluto. Os tubos foram agitados por aproximadamente 15 segundos, e centrifugados levemente. Todo conteúdo de cada amostra foi transferido para uma coluna *QIAamp* e centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm. Após a centrifugação, a solução de primeira passagem (filtrado) foi descartada e a coluna *QIAamp* foi transferida para um novo tubo *ependorf*. O DNA ligado à coluna foi lavado posteriormente com 500 µL do tampão de lavagem 1 (*Wash buffer 1 – AW1*).

Após centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm, o tubo contendo o filtrado foi novamente descartado e a coluna *QIAamp* foi transferida para novo tubo *ependorf*. Seguiu-se nova etapa de lavagem, adicionando 500 µL de tampão de lavagem 2 (*Wash buffer 2 - AW2*), seguida da centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. Posteriormente, o tubo contendo o filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para novo tubo. Neste, foram adicionados 200 µL de tampão de eluição (*Elution buffer - AE*), com uma nova centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto. O DNA genômico de cada amostra foi eluído e estocado em freezer a -20° C até a etapa seguinte.

#### **4.4.1.2. Extração do DNA total a partir das amostras teciduais**

A extração de aproximadamente 31 mg do DNA viral total, obtido a partir das amostras de lesões, foi realizado por meio do *kit de tecido QIAamp DNA*, conforme as instruções do fabricante (QIAGEN). Os tecidos foram macerados em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, e foram suspensos em 180 µL de tampão de digestão de tecido (*Tissue lysis buffer - ATL*) com 20 µL de proteinase K. Incubou-se a 56° C durante 1 hora no *Thermo Shaker TS-100*, os tubos contendo as amostras em suspensão, e posteriormente foram levemente centrifugados. Após, foram adicionados 200 µL de tampão AL, agitando-os por 15 segundos e, novamente, incubados a 70°C, por 10 minutos. Adicionaram-se 200 µL de etanol absoluto às amostras. As amostras foram homogeneizadas e transferidas para a coluna *QIAamp*. Após etapa de centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto, a solução de primeira passagem foi descartada e a coluna *QIAamp* foi transferida para novo tubo. O DNA ligado à coluna foi lavado posteriormente com 500 µL de tampão AW1. Após centrifugação a 8.000 rpm por 1 minuto, o tubo contendo o filtrado foi novamente descartado e a coluna *QIAamp* foi transferida para novo tubo *ependorf*. Seguiu-se nova etapa de lavagem adicionando 500 µL de tampão AW2, seguida da centrifugação a 14.000 rpm por 3 minutos. Finalmente, o tubo contendo o filtrado foi descartado e a coluna foi transferida para novo tubo. Adicionou-se 200 µL do tampão AE à coluna e centrifugou-se o material a 8.000 rpm por 1 minuto. O DNA genômico foi armazenado em freezer a -20° C.

#### 4.4.1.3. Análise da qualidade e quantidade do DNA genômico

A qualidade do DNA genômico extraída das amostras foi avaliada com 1,2 µL do corante Blue/Orange (Promega), cerca de 4 µL da “amostra teste” e também foram aplicados para análise do tamanho dos fragmentos 3 µL de marcador com peso molecular 1 kb DNA. A preparação do gel de agarose a 1,0% foi composta de tampão TAE (Tris, Ácido acético e EDTA, pH 8,0), H<sub>2</sub>O ultrapura, 1 g de agarose e 1,2 µL do corante Gel Red. Procedeu-se à corrida do gel na cuba horizontal *Amersham Pharmacia Biotech* a 60 V e 100 mA. A visualização do DNA foi mediante sistema *Bio Doc Analyze* (Biometra Ti 5). A quantificação das amostras foi realizada pelo leitor do espectrofotômetro *Gene Ray ultravioleta* (UV).

#### 4.4.1.4. Avaliação da qualidade do DNA genômico pela PCR do gene β-globina

O DNA genômico, extraído a partir das amostras de sangue e de lesões sugestivas de papilomatose, foi analisado por PCR para gene β-globina. Estes iniciadores amplificam um fragmento de DNA com aproximadamente 450 pares de base (bp) do gene da β-globina que tem sido empregado para avaliar a qualidade de DNA genômico extraído das amostras. As sequências de nucleotídeos dos iniciadores gene β-globina encontram-se representadas na Tabela 21. As amostras foram inseridas no termociclador *PTC-100 (Programmable Thermal Controller)* e analisadas conforme protocolo descrito a seguir. Após a desnaturação inicial em 94°C por 3 minutos, seguiram-se 35 ciclos de 94°C por 50 segundos, 60°C por um minuto, e 72°C por 1 minuto e extensão de 72°C por 5 minutos.

#### 4.4.1.5. Procedimento da reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA genômico extraído, a partir das amostras de sangue e de lesões sugestivas de papilomatose, foi analisado por PCR, utilizando *primers* degenerados FAP59/FAP64, que têm sido empregados para o diagnóstico de infecção pelo papilomavírus em humanos e animais, de forma genérica (OGAWA et al., 2004).



A escolha do par de *primers* FAP59/FAP64, utilizada no experimento, deveu-se à possibilidade de detecção de sequências de PV em diferentes espécies. As sequências de nucleotídeos e tamanho dos fragmentos esperados dos *primers* FAP59/FAP64 encontram-se representados na Tabela 23. Optou-se pelo uso da mistura de reagentes obtida comercialmente, denominada *Master Mix* (Promega), como forma conveniente de amplificar fragmentos de DNA, sem a necessidade de descongelar os componentes do mix separadamente, reduzindo o risco de contaminação e erros de pipetagem. O mix consistiu de 200  $\mu$ M de desoxinucleosídeos trifosfatados (dNTPs), 1 x tampão de reação Tris-HCl pH 8.4, 1,5 mM de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) e 1 U de enzima purificada da bactéria *Thermus aquaticus* (DNA *Taq polymerase*).

O volume total da reação de PCR, para cada amostra testada, consistiu de 31  $\mu$ L contendo 12,5  $\mu$ L do mix, 2  $\mu$ L de cada *primer* a 0,5  $\mu$ M, e quantidade variável de  $H_2O$  ultrapura e amostra testada. Essa variação é dependente da quantificação do DNA de cada amostra analisada. Na reação de PCR, utilizaram-se 8,5  $\mu$ L de  $H_2O$  ultrapura como controle negativo, 7  $\mu$ L de  $H_2O$  ultrapura e 1,5  $\mu$ L da amostra positiva amplificada anteriormente, utilizada para o controle positivo de papilomavírus no Laboratório de Genética do IBu-SP.

Baseando-se no estudo de Antonsson e Mc Millan, (2006, p. 3196) em animais australianos, foram utilizadas amostras de COPV, como controle positivo da reação de PCR e, como controle negativo, água ultrapura. Assim como no trabalho de Mello, foi utilizada linhagem de células contendo DNA do HPV-18 como controle positivo para a pesquisa em diversas espécies de primatas não-humanos (MELLO, 2005, p. 58). Tais controles foram estendidos neste presente trabalho, quando a amostra de papiloma de bovino, confirmadamente positiva para o DNA viral, foi utilizada como controle positivo padrão para as amostras das espécies animais estudadas.

As amostras foram inseridas no termociclador *PTC-100* e amplificadas, conforme protocolo descrito por Ogawa et al. (2004): desnaturação inicial em 94°C por 10 minutos, 45 ciclos de 94°C por um minuto e meio, 50°C por 1 minuto e meio, e 72°C por um minuto e meio, e extensão de 72°C por 5 minutos. Alíquotas dos fragmentos amplificados foram aplicadas em gel de agarose a 2,0% e visualizadas

através de luz ultravioleta (UV) usando um sistema de *software* para documentação em gel no equipamento *Bio Doc Analyze* (Biômetra Ti5).

Tabela 23. Sequências de nucleotídeos e tamanho do fragmento esperado de acordo com os iniciadores dianteiros e reversos

<b>Primer</b>	<b>Sequência<sup>c</sup></b>	<b>Fragmento (bp)</b>
FAP59 <sup>a</sup>	5´ - TTA CWG TIG GIC AYC CWT ATT - 3´	478
FAP64 <sup>a</sup>	5´ - CCW ATA TCW VHC ATI TCI CCA TC - 3´	478
β- globin FW <sup>b</sup>	5´ - AAC CTC TTT GTT CAC AAC CAG - 3´	450
β- globin REV <sup>b</sup>	5´ - CAG ATG CTT AAC CCA CTG AGC - 3´	450

<sup>a</sup>Ogawa et al., 2004

<sup>b</sup>Yagui et al., 2006

<sup>c</sup>Nucleotídeos degenerados: W = T, C; I = Inosina; Y = C, T; V = A, C, G; H = A, T, C.

#### 4.4.1.6. Procedimentos técnicos de purificação das amostras selecionadas

O produto de PCR foi analisado, por eletroforese em gel de agarose, para verificar a presença de somente uma banda visível. No entanto, ao analisar o gel, verificou-se que alguns produtos de PCR apresentaram múltiplas bandas de diferentes tamanhos de fragmentos, o que dificultou a análise e a interpretação dos resultados. Os produtos de interesse foram selecionados e utilizou-se o *kit* de purificação *GFX PCR DNA Purification Kit* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. O produto então purificado foi estocado a -20° C.

#### 4.4.1.7. Procedimentos técnicos de quantificação das amostras purificadas

Após a purificação dos produtos de PCR, foram utilizados 2 µL para quantificação dos mesmos em gel de agarose 2%, utilizando o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) como marcador de peso molecular. A concentração de cada amostra purificada foi determinada, comparando-se a intensidade da banda da

amostra amplificada no gel com a escala em ng do peso molecular. A concentração foi calculada dividindo a quantidade de ng pelo volume em  $\mu\text{L}$  de amostra aplicados.

#### 4.4.1.8. Sequenciamento

Os *primers* FAP59/FAP64, utilizados na reação de PCR, foram diluídos em água ultrapura na concentração de 5  $\mu\text{M}$  (ou 5 pmoles/ $\mu\text{L}$ ) para a reação de sequenciamento. As amostras purificadas foram selecionadas quanto à qualidade e concentração, uma vez que a qualidade do sequenciamento está diretamente proporcional à qualidade da amostra de PCR, um dos fatores mais críticos na etapa do sequenciamento. Para cada reação de sequenciamento, foram utilizados 5  $\mu\text{L}$  de produto de PCR purificado das amostras previamente selecionadas. Foram utilizados, para o controle de qualidade das reações, bem como de todos os demais processos, atestando a qualidade dos reagentes e de todos os procedimentos realizados no *MegaBACE 1000*, o DNA de M13 e o *primer* para M13, provenientes do próprio *Kit* de sequenciamento. Foi utilizada a tecnologia de sequenciamento automático de DNA de alta qualidade, a partir de produtos de PCR, utilizando o *MegaBACE 1000*, sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia *GE Healthcare*. As reações de sequenciamento foram realizadas, de acordo com o protocolo para o *MegaBACE 1000*, utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). Na reação, utilizaram-se: 4  $\mu\text{L}$  de *premix* (Dye Terminator) com 1  $\mu\text{L}$  de cada *primer* a 5  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{L}$  de PCR purificada e 10  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. Procedeu-se à ciclagem com 30 ciclos a: 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e finalizou com 10°C. Após o processo de ciclagem, as reações de sequenciamento foram purificadas por *Sephadex G 50* e aplicadas no *MegaBACE 1000*. As sequências foram analisadas pelo *software Sequence Analyser* utilizando o *Base Caller Cimarron 3.12*.

#### 4.4.2. Estudo citogenético

Para a análise citogenética, foi realizada a cultura dos linfócitos do sangue periférico (MOORHEAD et al., 1960), com algumas modificações, a fim de se obterem metáfases em quantidades satisfatórias para o estudo dos cromossomos.

##### 4.4.2.1. Cultura de linfócitos do sangue periférico

Procedeu-se à colheita de sangue, utilizando seringa rinsada com heparina sódica ou tubos *vacutainer* heparinizados, com agulha de calibre adequado para cada espécie. A desinfecção local foi feita com álcool. O volume de sangue variou entre as espécies, dado a diferença do tamanho e porte dos animais estudados. Entretanto, um volume mínimo de oito gotas foi necessário para cada cultura. Ao final da colheita, o sangue foi transportado em maleta térmica refrigerada ao Laboratório de Citogenética Animal da UFF.

O tempo total da cultura de linfócitos do sangue periférico foi de 72 horas. Foram adicionadas oito gotas do sangue total, aproximadamente 0,5 mL, em garrafas de cultivo contendo 6 mL de meio de cultura completo (meio de *Roswell Park Memorial Institute* – RPMI 1640), 2,0 mL de soro fetal bovino e 0,2 mL de fitohemaglutinina. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C por 71 horas. Após esse período, 0,2 mL de colchicina 16 µg/mL foram adicionados em todas as culturas. As garrafas permaneceram por mais uma hora na estufa a 37°C.

Ao final de 72 horas, as preparações foram transferidas para tubos de centrífuga Falcon e as amostras foram centrifugadas a 1.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e 5 mL de solução hipotônica de KCL 0,075 M foram adicionados ao precipitado. As preparações foram homogeneizadas gentilmente com pipeta Pasteur e mantidas na estufa a 37°C por 12 minutos. Seguiu-se nova centrifugação a 1.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi desprezado, e 10 mL de solução fixadora composta por metanol e ácido acético (3:1) foram adicionados.

As suspensões obtidas foram homogeneizadas e novamente centrifugadas a 1.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 5 mL de solução fixadora. Este procedimento foi repetido por

duas vezes e, ao final da operação, o *pellet* foi diluído e homogeneizado na solução fixadora. As lâminas previamente lavadas, imersas em água destilada, foram gotejadas com material fixado a uma determinada distância, com auxílio de pipeta Pasteur e coradas com solução de Giemsa a 3% em tampão fosfato pH 6.8 por 8 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ambiente. Cerca de 5 mL de fixador foram acrescentados às culturas para estocagem a -20°C.

#### **4.4.2.2. Cultura das lesões cutâneas**

Procedeu-se à colheita das lesões cutâneas suspeitas clinicamente de papilomatose em bovinos e caninos. Ao final da colheita, o tecido foi acondicionado em meio de cultura RPMI 1640, contendo os antibióticos: penicilina e estreptomicina, e imediatamente transportado em maleta térmica refrigerada ao Laboratório de Citogenética Animal.

Foi utilizada a técnica de cultura de tecidos de células neoplásicas de curta duração. Os fragmentos do tumor foram macerados com auxílio de tesoura e bisturi, aos quais foram adicionados 3mL do meio RPMI 1640, 0,2 mL de colchicina 16µg/mL e 1 mL de soro fetal bovino no frasco de cultura. O material foi incubado em estufa a 37°C por 40 minutos. Posteriormente, seguiu-se a etapa de centrifugação por 10 minutos a 1.000 rpm. Após descarte do sobrenadante, foram adicionados 10 mL de solução hipotônica KCL 0,075 M e procedeu-se à nova incubação a 37°C. Após 30 minutos na estufa, o material foi centrifugado por 10 minutos a 1.000 rpm, e desprezou-se a solução hipotônica. Em seguida, procedeu-se à etapa de fixação, adicionando 10 mL de solução fixadora de metanol: ácido acético (3:1).

As suspensões obtidas foram homogeneizadas e novamente centrifugadas a 1.000 rpm por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes e, ao final da operação, o precipitado foi diluído e homogeneizado na solução fixadora, para ser gotejado em lâmina a uma determinada distância, com auxílio de uma pipeta Pasteur. As lâminas contendo o material fixado foram coradas com solução de Giemsa a 3% em tampão fosfato-salina (PBS) pH 6,8 por 8 minutos e, em seguida, foram lavadas em água destilada. O tratamento das lâminas seguiu o mesmo protocolo da cultura de linfócitos.

Visando a obter uma melhor dissociação e melhor aproveitamento das células, também foi realizada a técnica de maceração do tumor, adicionando 0,5 mL de colagenase 0,2% no frasco de cultura. O material foi incubado a 37°C por 30 minutos e centrifugado a 1.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 10 mL do meio RPMI 1640, 0,2 mL de colchicina 16µg/mL e 1 mL de soro fetal bovino. O material foi levado à estufa a 37°C. Após 40 minutos de incubação, foi centrifugado a 1.000 rpm por 10 minutos e foram adicionados 10 mL de solução hipotônica KCL 0,075M e nova incubação 37°C por 30 minutos. As etapas de homogeneização e centrifugação seguiram o protocolo descrito anteriormente, assim como a fixação e a coloração das lâminas para análise. As culturas das lesões não utilizadas foram estocadas em freezer a -20°C em solução fixadora.

#### **4.4.2.3. Técnica de coloração convencional dos cromossomos**

As lâminas foram previamente lavadas com sabão neutro, de modo que foram totalmente desengorduradas. A fim de facilitar a distribuição do material fixado, uma película de água destilada foi deixada sobre a lâmina. O material resultante da cultura de linfócitos do sangue periférico, assim como o do cultivo de curta duração das lesões cutâneas, foi pingado sobre a lâmina com auxílio de pipeta Pasteur e a certa distância da mesma. As lâminas foram secas à temperatura ambiente, e coradas com solução de Giemsa a 3%, em solução tampão fosfato, pH 6,8. Após a coloração, as lâminas foram lavadas em água destilada e secas à temperatura ambiente.

#### **4.4.2.4. Análise das metáfases e montagem dos cariótipos**

As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico. A localização das metáfases foi feita inicialmente com a objetiva de 20X, sendo posteriormente analisadas utilizando-se a objetiva de imersão (100X). As melhores metáfases foram fotografadas com câmera digital *Sony CyberShot*. O cariótipo foi montado e analisado, utilizando o programa *Adobe Photopshop CS<sub>2</sub>* versão 9. Após a seleção

das metáfases e montagem dos cariótipos, estas foram classificadas quanto ao número de cromossomos, em: completas, incompletas ou com sobreposições (não adequadas para análise).

#### **4.4.2.5. Técnicas de bandamento cromossômico**

##### **4.4.2.5.1. Bandamento G ou método de coloração GTG**

Nessa técnica, por meio do tratamento com a enzima tripsina, seguido de coloração com corante Giemsa, os cromossomos metafásicos passam a exibir um padrão de bandas, alternado em bandas claras e escuras. A digestão enzimática é feita em uma solução de 50 mg de tripsina em 100 mL de solução de Dulbeco. As lâminas foram imersas nessa solução por 31 segundos e lavadas, em seguida, em PBS pH 6,8. Após secagem, foram coradas em solução de Giemsa a 3% em PBS pH 6,8 por 10 minutos, lavadas em água destilada, e secas à temperatura ambiente (TA) (SEABRIGHT, 1971).

##### **4.4.2.5.2. Bandamento C ou método de coloração CBG**

Após seleção das lâminas, aplicou-se o método de coloração CBG segundo Sumner (1972). As lâminas foram imersas em solução de HCL 0,2 N durante 1 hora. Após esse período, foram lavadas em água deionizada, e secas à temperatura ambiente. Posteriormente, foram imersas em cuba de vidro em banho-maria, contendo solução de hidróxido de bário  $[Ba(OH)_2]$ , a 5% a 50°C por 10 minutos. Após esse período, a solução de bário foi retirada sob água corrente. A lâmina foi lavada em água destilada, e seca à temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a imersão em solução salina de Citrato de Sódio (2XSSC) a 60°C em estufa, durante uma hora. Após esse período, a lâmina foi lavada em água deionizada e corada em solução de Giemsa a 3% em tampão fosfato, pH 6.8 por 15 minutos.

Foram realizadas variações da técnica de bandamento na tentativa de obtenção de um melhor resultado, tais como: diminuição do tempo de exposição das

lâminas imersas à solução HCL 0,2N, alteração da temperatura e tempo de exposição das lâminas à solução saturada de bário [Ba (OH)<sub>2</sub>] a 5% e diminuição do tempo de exposição das lâminas em solução salina.

#### 4.4.2.6. Análise estatística dos dados citogenéticos

Os dados coletados da técnica de citogenética foram analisados pelo programa *Statistical Package for the Social Sciences* – SPSS versão 13.0. Uma vez que o total de células não foi o mesmo para os animais avaliados, optou-se por considerar a proporção que cada valor representava no respectivo total de células. Para comparações, foram aplicados testes de significância estatística não-paramétricos, uma vez que as variáveis envolvidas seguiam distribuição normal e os tamanhos das amostras eram pequenos. Assim, para comparar as variáveis de um mesmo grupo de animais, foi utilizado o teste de Friedman e, para comparações pareadas (duas variáveis de um mesmo animal), foi computado o teste de Wilcoxon. Tais testes são empregados para testar diferenças entre variáveis ou grupos pareados, com hipótese nula de que os grupos comparados não apresentam diferenças significativas. Rejeita-se esta hipótese se  $p$ -valor for menor que 0,05, ou seja, as diferenças foram consideradas significativas sob o ponto de vista estatístico sempre que os  $p$ -valores associados às análises foram menores que 0,05.

#### 4.4.3. Histopatologia

Realizaram-se 18 biópsias a partir da colheita de fragmentos teciduais representativos *in vivo*. As amostras de tumoração eram clinicamente suspeitas de papilomatose. Das 18 amostras, 11 foram obtidas de bovinos da região Norte Fluminense, três de caninos da região do Sul Fluminense, uma de arara e uma de leão, ambos provenientes da Fundação RIOZOO, uma de um primata do DEPRIM-CECAL na FIOCRUZ e uma de “javali” da região Sul do Pantanal Mato-grossense. Todos os animais foram registrados e protocolados individualmente. As amostras foram acondicionadas em recipientes transparentes e imersas em solução fixadora



tamponada de formalina a 10%, na proporção mínima de 15 partes da solução para uma de amostra(s), a fim de garantir boa penetração do fixador e assegurar a integridade física, química e morfológica da amostra. Estas foram remetidas ao Setor de Morfologia e Anatomia Patológica do Laboratório de Sanidade Animal no HV-UENF.

Visando ao diagnóstico anatomopatológico, aplicou-se a histotécnica para a produção de espécimes histológicos. Em síntese, o processamento tecidual consistiu de etapas de fixação por um período mínimo de 48 horas: clivagem em pequenos fragmentos a partir da eleição macroscópica de uma área da amostra, seguida por banhos sucessivos de substâncias desidratantes, clarificadoras e infiltradoras, com emblocamento por embebição em parafina (processador automático de tecidos TP1020, *LEICA*), microcortes com 5  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo rotativo (micrótomo semiautomático RM2145, *LEICA*), pescagem dos cortes histológicos em lâminas de vidro, coloração das secções, montagem das lâminas para análise e fotodocumentação das alterações através das lentes *MDC LENS COOLPIX 995* acopladas ao microscópio óptico NIKON.

Como rotina, aplicaram-se, nos cortes histológicos, corantes não-seletivos como a hematoxilina e eosina (H&E). A hematoxilina é um corante básico com afinidade pelas estruturas ácidas das células, que confere coloração nuclear de tonalidades azuladas ou arroxeadas. Contrasta com a eosina, por ser um corante ácido que possui afinidades por estruturas básicas das células, corando em rosa ou vermelho o citoplasma e elementos extracelulares (CRESPO, 2006).

## 5. RESULTADOS

No estudo da infecção latente, foram colhidas 86 amostras de sangue de animais de diversas espécies animais sem sinais clínicos aparentes de lesões verrucosas. Foi analisado, por PCR, um total de 58 amostras, sendo 11 amostras de bovinos, 12 de equinos, 10 de ovinos, nove de suínos, 10 de caninos, duas de araras, duas de avestruzes e duas de onças sem sintomatologia clínica. Destas, 18 amostras apresentaram sequências de DNA do PV, utilizando o par de oligonuclotídeos degenerados FAP59/FAP64.

No estudo da infecção clínica, foram registrados 20 casos de animais, sendo 10 bovinos, três equinos, três caninos e quatro animais silvestres, com suspeita clínica de lesões pré-malignas e malignas da mucosa ou tecido cutâneo. Foram analisadas, por PCR, 27 amostras clínicas (10 amostras de sangue dos bovinos, três dos equinos, três dos caninos e uma amostra de sangue de “javali”). Destas, as lesões dos bovinos e amostras sanguíneas dos três caninos apresentaram sequências do DNA viral sugestivas da infecção viral.

No total das amostras sanguíneas e de tecidos dos animais afetados clinicamente ou não, submetidos à amplificação do gene L1 de PV, em ensaios de PCR, 31 espécimes biológicos de animais pertencentes às espécies *Canis familiaris*, *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Panthera onca*, *Felis concolor*, *Ara chloroptera*, *Ara macao* e *Struthio camelus* geraram fragmentos de amplificação do DNA viral.

### 5.1. Estudos moleculares

#### 5.1.1. Amplificação dos produtos da reação de PCR

Apesar de ter sido investigado o gene  $\beta$ -globina nas espécies de mamíferos (Figura 14), todas as amostras testadas foram consideradas elegíveis para a pesquisa por PCR de sequências de DNA de PV, com exceção de algumas amostras do grupo das aves e das amostras de plasma dos bubalinos que não apresentaram DNA genômico. Não foi verificada, nas amostras sanguíneas dos

bovinos, suínos e dos eqüinos, a presença de bandas amplificadas da reação de PCR utilizando os *primers* degenerados.

A técnica de extração do DNA nas amostras das aves apresentou certa dificuldade, mesmo após algumas repetições, face às hemácias das araras e avestruzes serem nucleadas, e o protocolo de extração de amostras sanguíneas não ser específico para essas espécies, sendo aplicável em mamíferos por não conterem núcleos nas hemácias. Ainda assim, foram selecionadas ao menos duas amostras de cada espécie em questão para a reação de PCR. Já nas amostras de plasma dos bubalinos, somente uma delas apresentou DNA genômico, optando-se pela não continuidade do estudo nas amostras desta espécie animal.

Foram detectadas, em espécimes biológicos de diversas espécies e entre espécies animais, variações quanto ao tamanho em bp dos fragmentos amplificados por PCR, utilizando o par de *primers* degenerados FAP59/FAP64, construído a partir de amostras suecas humanas para amplificação do gene viral L1 (Tabela 24). Em amostras de caninos com lesões cutâneas, foram amplificadas três bandas de aproximadamente 420 bp, 700 bp e 800 bp. Nas amostras sanguíneas dos caninos clinicamente saudáveis, foram amplificadas sequências do DNA viral, apresentando *amplicons* de 700 bp de tamanho. As amostras de seis caninos também geraram bandas de 800 bp. Em amostras de sangue de ovinos clinicamente livres de papilomas, foram amplificadas duas bandas de aproximadamente 780 bp e 580 bp e única banda, com tamanho de 580 bp, foi detectada na amostra do outro ovino pesquisado. No grupo das aves clinicamente saudáveis, os avestruzes amplificaram bandas de 280 bp e 600 bp, a arara *Ara chloroptera* gerou fragmento de 180 bp, e a *Ara macao* gerou três bandas de 300 bp, 400 bp e 600 bp. As amostras de sangue dos felinos silvestres geraram dois fragmentos de 200 bp e 1.000 bp. Outra banda também foi amplificada, gerando fragmento de aproximadamente 480 bp e 390 bp para as espécies *Panthera onca* e *Felis concolor*, respectivamente.

Tabela 24. Comparação dos tamanhos dos amplicons gerados quanto às espécies diversificadas

<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Identificação</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
<i>Canis familiaris</i>	Cão doméstico	CoPV -1,-2,-3	420, 700, 800
		Co -5,-6,-7,-9	700
		Co -1,-2,-3,-4,-8,-10	700 e 800
<i>Struthio camelus</i>	Avestruz	Av-7 Av-8	280, 600
<i>Ara chloroptera</i>	Arara vermelha	Ara-1	180
<i>Ara macao</i>	Araracanga	Ara-2	300, 400, 600
<i>Panthera onca</i>	Onça pintada	On-1	200, 480, 1.000
<i>Felis concolor</i>	Puma	On-2	200, 390, 1.000

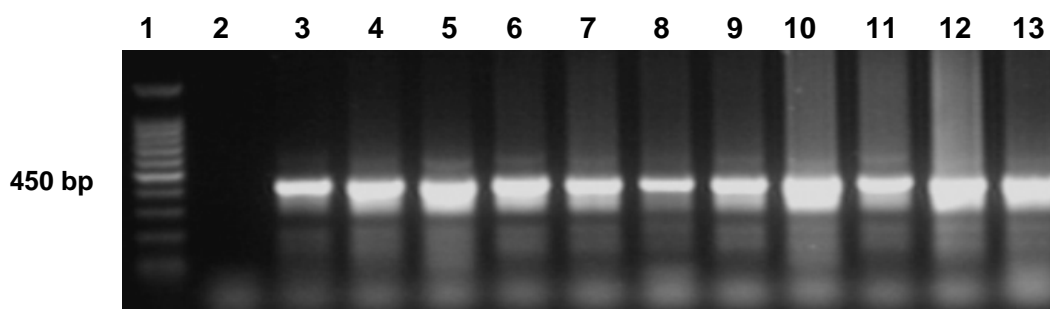


Figura 14. Eletroforese, em gel de agarose a 2%, das amostras dos bovinos para PCR  $\beta$ -globina. No poço 1, marcador de peso molecular (100 bp); poços 2 e 3, controles negativo e positivo, respectivamente; poços 4 a 13, amostras amplificadas.

Os géis das Figuras 15 e 16 exibem os fragmentos gerados pela PCR com os iniciadores genéricos de PV, FAP59/FAP64, conforme visualizado a seguir.

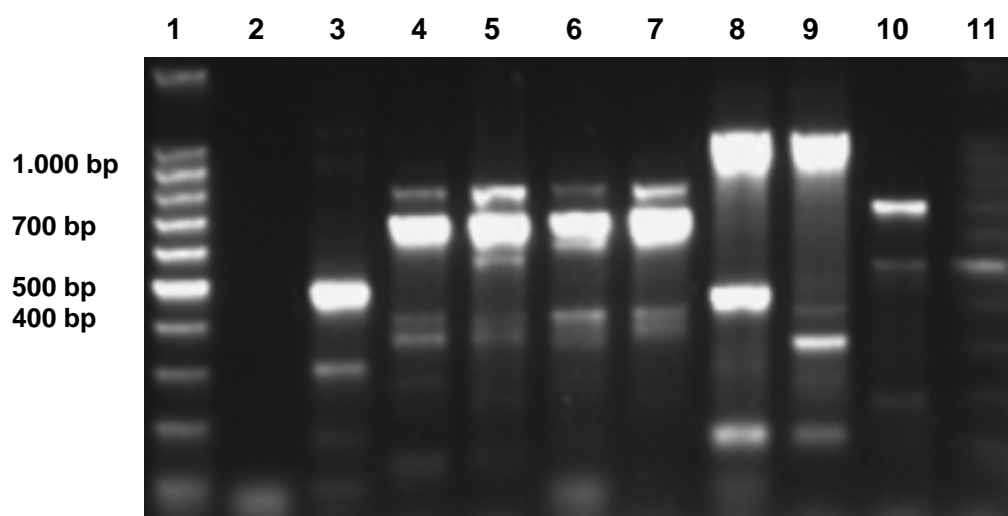


Figura 15. Eletroforese, em gel de agarose a 2%, das amostras de DNA dos animais domésticos e silvestres, obtidas a partir de sangue e amplificadas por PCR, para a detecção do papilomavírus. 1: marcador de peso molecular; 2: controle negativo; 3: controle positivo; 4 a 7: amostras de cães; 8 e 9: amostras de onças; 10 e 11: amostras de ovinos.

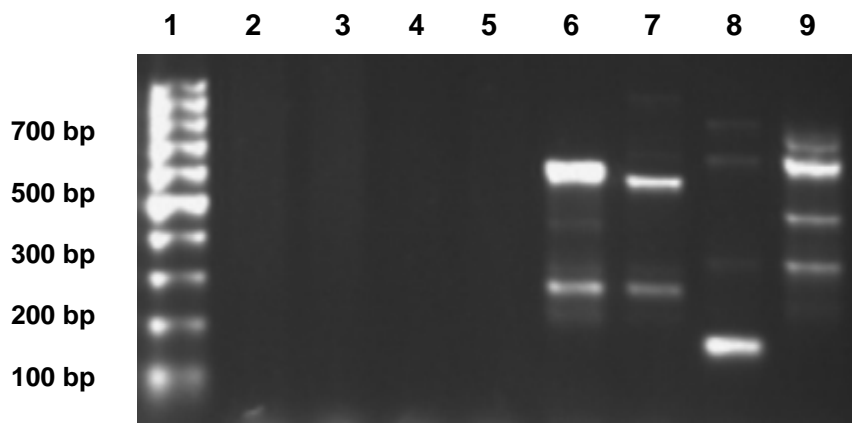


Figura 16. Eletroforese, em gel de agarose a 2%, das amostras de DNA de aves, obtidas a partir de sangue e amplificadas por PCR, para a detecção do papilomavírus. 1: marcador de peso molecular; 2 a 5: amostras de bovinos; 6 e 7: amostras de araras; 8 e 9: amostras de avestruzes

O gel da Figura 17, apresentado a seguir, permite avaliar a presença de bandas amplificadas em espécimes biológicos de caninos saudáveis, livres de lesões papilomatosas.

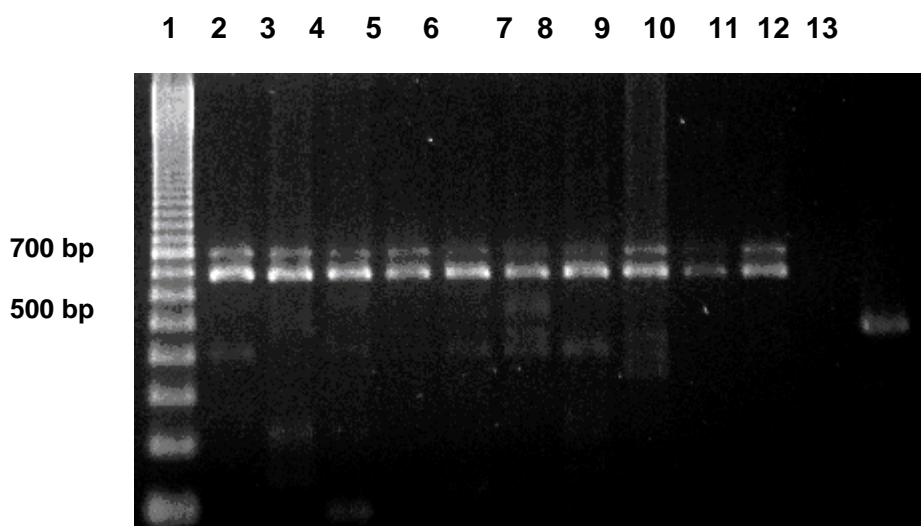


Figura 17. Eletroforese, em gel de agarose a 2%, das amostras de DNA de caninos, obtidas a partir de sangue e amplificadas por PCR, para a detecção do papilomavírus. 1: marcador de peso molecular; 2 a 11: amostras de caninos; 12: controle negativo e 13: controle positivo.

### 5. 1.2. Purificação e quantificação de produtos da PCR

Os géis apresentados a seguir, nas Figuras 18 a 20, referem-se aos produtos purificados e quantificados das amostras selecionadas de espécies animais que apresentaram bandas amplificadas na reação de PCR. Os produtos purificados e quantificados revelaram a concentração, nas amostras dos caninos e avestruzes, variando em torno de 5 a 10ng/μL; nos ovinos, de 5ng/μL; nas araras, apresentaram aproximadamente 10ng/μL; e a concentração das amostras sanguíneas nas onças foi de 20ng/μL.

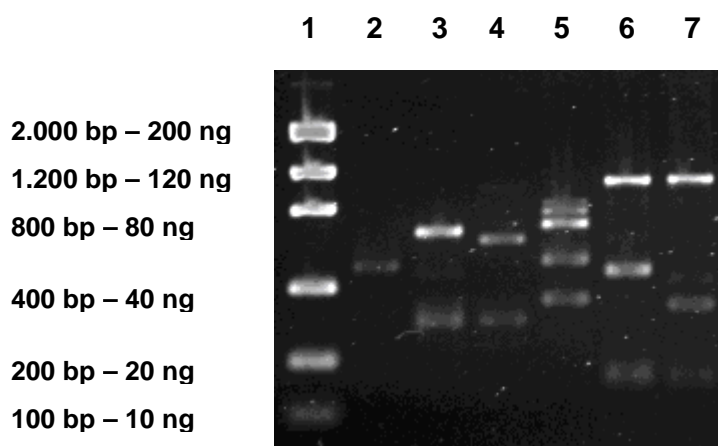


Figura 18. Eletroforese, em gel de agarose a 2%, dos produtos purificados por PCR, a partir de DNA extraído de amostras sanguíneas de animais silvestres, para detecção do papilomavírus. 1: marcador de peso molecular; 2: controle positivo (~5ng/μL); 3 e 4: amostras avestruzes (~10ng/μL e ~5ng/μL); 5: amostra arara (~10ng/μL); 6 e 7: amostras onças (~20ng/μL).

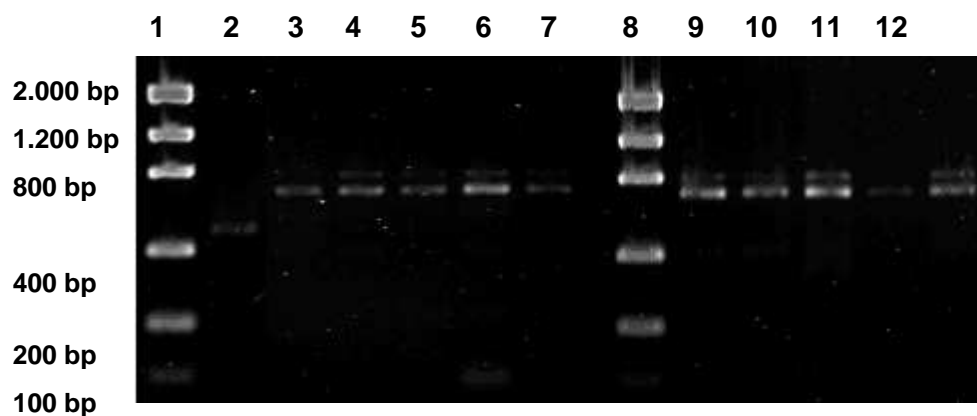


Figura 19. Eletroforese, em gel de agarose a 2%, dos produtos amplificados por PCR, a partir de DNA extraído de amostras sanguíneas de caninos, para detecção do papilomavírus. 1 e 7: marcador de peso molecular; 2: controle positivo ( $\sim 5\text{ng}/\mu\text{L}$ ); 3, 4, 5, 6, 9 e 12 amostras de caninos ( $\sim 5\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 8 e 10: amostra de canino ( $\sim 10\text{ng}/\mu\text{L}$ ); 11: amostra canina (inferior a  $5\text{ng}/\mu\text{L}$ ).

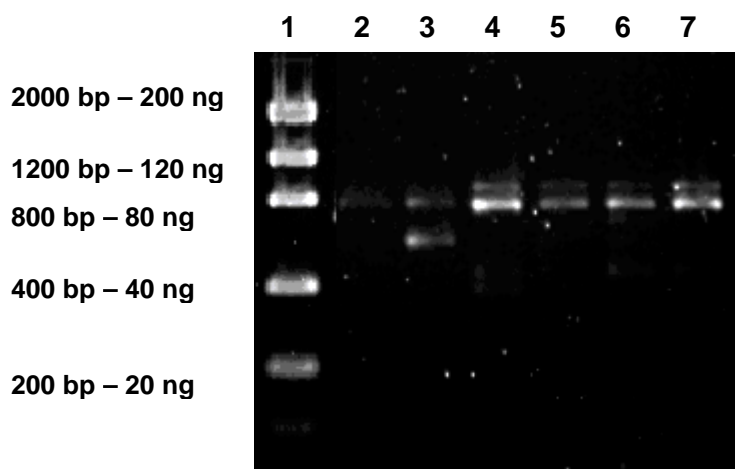


Figura 20. Eletroforese do gel dos produtos purificados por PCR, a partir de DNA extraído de amostras sanguíneas de ovinos e caninos, para detecção do papilomavírus. 1: marcador de peso molecular; 2 e 3: amostras de ovinos; 4 e 7: amostras de caninos ( $\sim 10\text{ng}/\mu\text{L}$ ); 5 e 6: amostras de caninos ( $5\text{ng}/\mu\text{L}$ ).



### 5.1.3. Sequenciamento de produtos da PCR

Foram analisadas 14 amostras (RMA23, RMA28, RMA29, RMA42, RMA43, RMA45, RMA46, RMA47, RMA75, RMA78, RMA95, RMA96, RMA97, RMA98) com o par de *primers*, FAP59/FAP64. A qualidade das sequências obtidas foi avaliada pelo programa *Chromas* versão 2.33 e/ou pelo *software Biological Sequence Alignment Editor (BioEdit)*. As identidades dos produtos foram pesquisadas utilizando-se o programa do Banco de Alinhamento Básico Local (*Basic Local Alignment Search Tool – BLAST*), para comparação com as sequências depositadas no *GenBank* do Centro Nacional de Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*) e identificação da similaridade do PV interespecies (ALTSCHUL et al., 1990).

### 5.1.4. Análise e alinhamento das sequências de nucleotídeos

Por meio da amostra de papiloma bovino 8 (RMA28) amplificada pela análise de PCR, foram encontrados 100% de similaridade com os papilomavírus do HPV-97 isolado W15189 (nt:215-228 e 6529-6516), com o genoma completo do HPV-97 isolado 624 (nt:215-228 e 6529-6516) e com HPV-97, genoma completo (nt:215-228 e 6529-6516). Pela análise da sequência de nucleotídeos do gene L1, foi possível demonstrar que o genoma do bovino está estritamente relacionado com o genoma completo da espécie *Lynx rufus papillomavirus 1* (nt:11-27 e 4649-4633), apresentando 94% de similaridade. A sequência de nucleotídeos da amostra RMA28 revelou 90% de similaridade genética com o gene parcial E1 do HPV-7 isolado alb (nt:151-170 e 32-12) e com o gene E1 HPV isolado HPV-alb-7 (nt:151-170 e 32-12).

```

215   CACACAGTGTTAAA   228   amostra RMA28
      |||||||||||||
6529  CACACAGTGTTAAA   6516  Human papillomavirus 97 isolado W15189, genoma completo

11    ACATTGTAGAGACAAAAG   27    amostra RMA28
      |||||||||||||
4649  ACATTGTAGAGAGAAAAG   4633  Lynx rufus papillomavirus 1, genoma completo

151   TGTATCCATAT-AATCCACCA   170   amostra RMA28
      |||||||||||
32    TGTATCCATATAAATCCAGCA   12    HPV isolado HPV-alb-7 E1 proteína (E1) gene.

```

Foram encontrados 100% de similaridade pelo alinhamento da sequência dos nucleotídeos da amostra RMA29, obtida a partir de lesões de papilomas do bovino 9, com o genoma completo da espécie *Erethizon dorsatum papillomavirus 1* (nt:66-79 e 5623-5610) e com o genoma completo da espécie *Ovine papillomavirus 1* (nt:67-80 e 5750-5737).

```

66      CTCAGTTTCTGCAT   79      amostra RMA29
      |||
5623    CTCAGTTTCTGCAT   5610    Erethizon dorsatum papillomavirus 1, genoma completo

67      TCAGTTTCTGCATG   80      amostra RMA29
      |||
5750    TCAGTTTCTGCATG   5737    Ovine papillomavirus 1 genoma completo

```

Somente a amostra RMA23, referente ao tecido cutâneo papilomatoso do bovino 3, não apresentou similaridade quando comparada com as sequências de papilomavírus armazenadas no banco de dados.

Foram encontrados 91% de similaridade pelo alinhamento da sequência dos nucleotídeos do gene L1 do canino 5, sem sinais clínicos de papilomatose (RMA75) com o gene L1 do HPV-14 (nt:224-245 e 23-45), e 90% de similaridade com o genoma completo das espécies *Equus caballus papillomavirus 1* e *Equinus papillomavirus*.

```

224    GAGCTCT-GAAGATTATACTGCA   245    amostra RMA75
      |||
23     GAGCTATAGAAGATTATACTGCA   45     HPV isolado HPVX14 L1 proteína gene, parcial

161    GACAAC TAGCAAGGACAATA   180    amostra RMA75
      |||
6932   GACAAATAGCAAGGACACTA   6913   Equus caballus papillomavirus 1, genoma completo

161    GACAAC TAGCAAGGACAATA   180    amostra RMA75
      |||
6911   GACAAATAGCAAGGACACTA   6892   Equinus papillomavirus, genoma completo

```

Pelo alinhamento das sequências dos nucleotídeos, foi possível detectar 100% de similaridade nas posições nucleotídicas (nt:639-655 e 394-410) do gene parcial L1 do HPV (clone vs75-3), assim como 100% de similaridade foi encontrada nas posições nucleotídicas (nt:642-656 e 133-147) do gene L1 do capsídeo viral do

HPV (clone vs203-2), demonstrando estreita relação com a amostra sanguínea do DNA canino 8 clinicamente sadio (RMA78).

```

639  CAGAATGATATATATGG  655  amostra RMA78
      |||
394  CAGAATGATATATATGG  410  Human Papillomavirus vs75-3 DNA, parte do ORF L1

642  AATGATATATATGGT  656  amostra RMA78
      |||
133  AATGATATATATGGT  147  HPV DNA da proteína do capsídeo gene L1 (clone vs203-2)

```

Pela análise da sequência de nucleotídeos da amostra sanguínea do canino 1, ausente de lesões cutâneas (RMA95), foi possível verificar que o genoma analisado apresentou 100% de similaridade com o genoma completo do HPV-5, -5b, -8 e -36; HPV-47; DNA genômico do HPV12; genes L1 e L2 do HPV-5; DNA do HPV-5, ocorrendo naturalmente deleções nas regiões tardias do vírus; gene parcial L2 do HPV; sequência do gene L2 HPV; e com o genoma completo das espécies *European elk papillomavirus* e *Reindeer papillomavirus*, em diferentes posições nucleotídicas de alinhamento.

```

721  TTTTGAAAAGAAAAT  735  amostra RMA95
      |||
997  TTTTGAAAAGAAAAT  1011  European elk papillomavirus, genoma completo

721  TTTTGAAAAGAAAAT  735  amostra RMA95
      |||
862  TTTTGAAAAGAAAAT  876  Reindeer papillomavirus, genoma completo

726  AAAAGAAAATATTTG  740  amostra RMA95
      |||
1888 AAAAGAAAATATTTG  1902 HPV tipo 5 L2 (L2) and L1 (L1) genes

726  AAAAGAAAATATTTG  740  amostra RMA95
      |||
5887 AAAAGAAAATATTTG  5901 HPV 5 DNA e deleções ocorrendo naturalmente na região
tardia do vírus

726  AAAAGAAAATATTTG  740  amostra RMA95
      |||
5815 AAAAGAAAATATTTG  5829 Human papillomavirus 12 DNA genômico

```

726	AAAAGAAAATATTTG	740	amostra RMA95
5887	AAAAGAAAATATTTG	5901	<i>Human papillomavirus</i> tipo 5, genoma completo
726	AAAAGAAAATATTTG	740	amostra RMA95
5873	AAAAGAAAATATTTG	5887	HPV tipo 47 (HPV-47) +-sense strand
726	AAAAGAAAATATTTG	740	amostra RMA95
5820	AAAAGAAAATATTTG	5834	<i>Human papillomavirus</i> 8, genoma completo
726	AAAAGAAAATATTTG	740	amostra RMA95
5860	AAAAGAAAATATTTG	5874	<i>Human papillomavirus</i> 36, genoma completo
726	AAAAGAAAATATTTG	740	amostra RMA95
5893	AAAAGAAAATATTTG	5907	<i>Human papillomavirus</i> 5b, genoma completo
726	AAAAGAAAATATTTG	740	amostra RMA95
118	AAAAGAAAATATTTG	132	<i>Human papillomavirus</i> L2 proteína (L2) gene sequência
726	AAAAGAAAATATTTG	740	amostra RMA95
34	AAAAGAAAATATTTG	48	<i>Human papillomavirus</i> L2 proteína (L2) gene sequência

Por meio da amostra do canino 6, sem sinais clínicos de papilomatose (RMA 96), foram encontrados 94% de similaridade com o DNA genômico do HPV-40. A amostra analisada também apresentou estreita relação com o genoma completo do HPV-82, demonstrando 100% de similaridade nas posições nucleotídicas (nt:161-175 e 971-985).

162	GACGATGAGGAGGACATA	179	amostra RMA96
973	GAGGATGAGGAGGACATA	990	<i>Human papillomavirus</i> 40 DNA genômico
161	AGACGATGAGGAGGA	175	amostra RMA96
971	AGACGATGAGGAGGA	985	<i>Human papillomavirus</i> 82 DNA, genoma completo

A amostra adenocarcinomatosa do canino 1, portador de lesões cutâneas (RMA97), apresentou, pelo alinhamento das sequências dos nucleotídeos, 94% de similaridade com o genoma completo do HPV-28 e 90% de similaridade com as sequências do gene parcial L1, maior proteína do capsídeo viral da espécie *Trichosurus vulpecula papillomavirus*. A sequência da amostra canina também revelou 85% de similaridade com o genoma completo do HPV-74, subtipo AE10, e apresentou 76% de similaridade com o genoma completo da espécie *Bandicoot papillomatosus carcinomatosus virus 2*.

```

551   GGAAAATTTCCCTTGGCNAGAGCCA--TAAGAACACCTATGGT   591 amostra RMA97
      ||||| ||||| |||  ||  |||||  |||  |||||  ||  |||||
3888  GGAACATTTCCCATGGTTAGTGCCAATTA AAAACA AACTGTGGT   3846 Bandicoot papillomatosus
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
carcinomatosus virus tipo 2, genoma completo

```

```

159   ATAATTTCTCTATCCCTGTGT   179 amostra RMA97
      ||||| ||||| |||  ||||| |||||
350   ATAATTTCTCCATCTCTGTGT   330 Trichosurus vulpecula papillomavirus maior proteína do
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
capsídeo L1 gene, parcial cds

```

```

163   TTTCTCTATCCCTGTGTGTTCCCTGTTT   189 amostra RMA97
      |||  ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
7304  TTTATCTATCCCTGTG---TCCTGTTT   7327 HPV tipo 74 subtipo AE10, genoma completo

```

```

528   TTGGGACATATGTCAAGGT   546 amostra RMA97
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
3822  TTGGGACATATGTCAATGT   3840 HPV tipo 28, genoma completo

```

```

168   TATACCTGTGGTGTTCCTGTTATTG   192 amostra RMA98
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
4272  TATAACTGTGTTGTTACTGTTATTG   4296 HPV tipo 40 DNA genômico

```

```

689   TATATACCTAATTTATAAANCA   710 amostra RMA98
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
312   TATACACCTAATTAATAAATCA   291 HPV tipo 31 strain P1300 E6 proteína (E6) gene

```

```

689   TATATACCTAATTTATAAANCA   710 amostra RMA98
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
312   TATACACCTAATTAATAAATCA   291 HPV tipo 31 strain P1160 E6 proteína (E6) gene

```

```

689   TATATACCTAATTTATAAANCA   710 amostra RMA98
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
312   TATACACCTAATTAATAAATCA   291 HPV tipo 31 strain P45 E6 proteína(E6) gene

```

689	TATATACCTAATTTATAAANCA	710	amostra RMA98
312	TATACACCTAATTAATAAATCA	291	HPV tipo 31 strain P313 E6 proteína (E6) gene, completo cds
689	TATATACCTAATTTATAAANCA	710	amostra RMA98
380	TATACACCTAATTAATAAATCA	359	HPV tipo 31 isolado PT111FF E6 proteína gene, completo cds
689	TATATACCTAATTTATAAANCA	710	amostra RMA98
380	TATACACCTAATTAATAAATCA	359	<i>Human papillomavirus</i> 31 isolado PT607-06 E6 proteína gene, parcial CDs
689	TATATACCTAATTTATAAANCA	710	amostra RMA98
380	TATACACCTAATTAATAAATCA	359	<i>Human papillomavirus</i> 31 isolado PT507-06 nonfunctional E6 proteína gene, parcial sequência
689	TATATACCTAATTTATAAANCA	710	amostra RMA98
177	TATACACCTAATTAATAAATCA	156	<i>Human papillomavirus</i> 31 isolado PT382-06 E6 proteína gene, parcial cds
689	TATATACCTAATTTATAAANCA	710	amostra RMA98
355	TATACACCTAATTAATAAATCA	334	HPV 31 isolado PT324-06 E6 proteína gene,
689	TATATACCTAATTTATAAANCA	710	amostra RMA98
285	TATACACCTAATTAATAAATCA	264	<i>Human papillomavirus</i> 31 isolado PT270-03 E6 proteína gene, parcial cds
689	TATATACCTAATTTATAAANCA	710	amostra RMA98
396	TATACACCTAATTAATAAATCA	375	<i>Human papillomavirus</i> 31 isolado PT669-06 E6 proteína gene, completo cds
553	ATTATTGGGTGAAGGTGGAA	572	amostra RMA98
5937	ATTATCGGGTGAAGGGGAA	5956	<i>Tursiops truncatus papillomavirus</i> 2, genoma completo
689	TATATACCTAATTTATAAANCA	710	amostra RMA98
312	TATACACCTAATTAATAAATCA	291	<i>Human papillomavirus</i> 31 isolado BR1692 E6 proteína (E6) gene, completo cds

689 TATATACCTAATTTATAAANCA 710 amostra RMA98  
 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

312 TATACACCTAATTAATAAATCA 291 *Human papillomavirus* 31 isolado MR9917 E6 proteína  
 (E6) gene, completo cds

553 ATTATTGGGTGAAGGTGGAA 572 amostra RMA98  
 ||||| ||||| ||||| |||||

122 ATTATCGGGTGAAGGGGGAA 141 *Tursiops truncatus papillomavirus* 2 maior proteína do  
 capsídeo L1 gene, completo cds

791 TAACAAAAACGTG-AGTACCATTTC 814 amostra RMA98  
 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

4324 TAACAAAAACGTGAATTACAATTTC 4300 *Pygmy Chimpanzee papilloma virus* 1 DNA

168 TATACCTGTGGTGTTCCTGTTATTG 192 amostra RMA98  
 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

4310 TATAACTGTATTGTTACTGTTATTG 4334 HPV tipo 7 genômico DNA

462 GAAACACCAATTTGAGCATT 481 amostra RMA98  
 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

35 GAAACACCAATTTTCAGTATT 54 HPV DNA parcial HPV L1, clone DL332

27 TAGTACTTACTCCTAAGG 44 amostra RMA98  
 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

204 TAGTACCTACTCCTAAGG 187 *Human papillomavirus* isolado FA40 maior proteína do  
 capsídeo L1 gene, parcial cds

689 TATATACCTAATTTA 703 amostra RMA98  
 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

7361 TATATACCTAATTTA 7375 HPV tipo 74 subtipo AE10, genoma completo

27 TAGTACTTACTCCTAAGG 44 amostra RMA98  
 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

101 TAGTACCTACTCCTAAGG 84 HPV isolado FANIMVS17 maior proteína do capsídeo(L1)  
 gene, parcial cds

675 TATATATCTCTGTGTATATAC-CTAATTTATA 705 amostra RMA98  
 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

162 TATATATATGTGTGTATGTACTCTTATGTATA 193 HPV tipo 6 isolado HPV-6f7rt, região não  
 codificante

462 GAAACACCAATTTGAGCATT 481 amostra RMA98  
 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||

6896 GAAACACCAATTTTAGTATT 6915 *Human papillomavirus* 8, genoma completo

A amostra sanguínea do avestruz 7 da espécie *Struthio camelus* (RMA42) apresentou 100% de similaridade, na posição nucleotídica (nt:64-81 e 3623-3640), com o genoma completo do HPV-74, subtipo AE10, pelo alinhamento das sequências dos nucleotídeos.

```

64      A C A C T A A C A T A T G C T A A T      81      amostra RMA42
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3623   A C A C T A A C A T A T G C T A A T      3640 HPV tipo 74 subtipo AE10, genoma completo

```

Por meio do alinhamento das sequências de nucleotídeos da amostra sanguínea do avestruz 8, da espécie *Struthio camelus* (RMA43), foram encontrados 81% de similaridade com o DNA genômico do HPV-34, 88% de similaridade com o genoma completo do BPV-3 e 94% de similaridade com o HPV-107.

```

400    C A T G C A T G A C A T A A C --- T A C G A G C A C A C A A T A C A C A      433 amostra RMA43
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
7112   C A T A C A T T A C A T A A C A T A T A C A A A C A C A C A A T A C A C A      7076 HPV34 DNA genômico

```

```

316    C A G C T G C A G G A G A C A C T G A C A C T A C      340 amostra RMA43
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
4201   C A G C T G C A G G A G A C C C T G A A A T T A C      4231 BPV-3, genoma completo

```

```

316    C A G C T G C A G G A G A C A C T G A C A C T A C      340 amostra RMA43
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
4492   C A G C T G C A G G A G A C C C T G A A A T T A C      4516 BPV-3 genoma completo

```

```

526    T A C A T C C A C A C A C A A A C G      543 amostra RMA43
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
4075   T A C A T C C A C A C A C C A A C G      4092 HPV tipo 107, genoma completo

```

A sequência do nucleotídeo da amostra sanguínea da espécie *Ara macao*, referente à arara 2 (RMA45), apresentou 100% de identidade na posição nucleotídica (nt:1001-1016) com o genoma completo da espécie *Uncia uncia papillomavirus 1* (nt:3154-3169).

```

1001   C A C C A A G A C C A G G A A A      1016 amostra RMA45
      | | | | | | | | | | | | | | | | | |
3154   C A C C A A G A C C A G G A A A      3169 Uncia uncia papillomavirus 1, genoma completo

```





(Figura 21), e 276 células apresentando alterações sugestivas de condensação prematura de cromossomos (Tabela 25).

As alterações numéricas classificadas como hipoploidia compreendem a ausência de um a 53 cromossomos por metáfase, sendo a maioria com perda de cinco cromossomos; e aquelas classificadas como hiperploídia representam a presença de um a 60 cromossomos adicionais por metáfase.

Tabela 25. Número de metáfases completas, com alterações numéricas e células com condensação prematura dos cromossomos (PCC), encontradas na cultura de linfócitos do sangue periférico de bovinos com papilomatose

Identificação	Completas (2n = 60)	Metáfases		PCC	Células
		Alterações numéricas			
		Hipoploidia	Hiperploídia		
Bovino 01	06	04	-	04	<b>14</b>
Bovino 02	22	47	03	07	<b>79</b>
Bovino 03	45	191	11	56	<b>303</b>
Bovino 04	30	44	06	111	<b>191</b>
Bovino 05	31	61	08	12	<b>112</b>
Bovino 06	06	33	05	15	<b>59</b>
Bovino 07	0	02	-	32	<b>34</b>
Bovino 08	04	08	-	12	<b>24</b>
Bovino 09	01	03	-	03	<b>07</b>
Bovino 10	32	49	04	24	<b>109</b>
<b>Total</b>	<b>177</b>	<b>442</b>	<b>37</b>	<b>276</b>	<b>932</b>

Foram encontradas, na cultura de linfócitos do sangue periférico de bovinos, 42 células com anomalias cromossômicas estruturais (Tabela 26). As aberrações cromossômicas estruturais foram sugestivas de: associação cromossômica, cromátides abertas, quebra, "gap", fusão cromossômica, PCC e fragmentos cromossômicos. Apenas o bovino 08 apresentou fragilidade no cromossomo sexual X (Figura 22). As alterações estruturais e numéricas similares às fusões, cromátides

abertas, PCCs (Figura 23) e associações (Figura 24) foram observadas no grupo de bovinos não exposto à ingestão da samambaia do campo, os quais apresentaram clinicamente papilomas e fibropapilomas confirmados pela histopatologia.

Tabela 26. Frequência das células analisadas com aberrações cromossômicas estruturais nos linfócitos do sangue periférico de bovinos com papilomatose e dieta livre da samambaia do campo

Identificação	Células		
	Com anormalidades cromossômicas	Total analisado	Com anormalidades cromossômicas (%)
Bovino 01	01	10	10,00
Bovino 02	01	72	1,38
Bovino 03	09	247	3,64
Bovino 04	06	80	7,5
Bovino 05	05	100	5,00
Bovino 06	01	44	2,27
Bovino 07	-	02	-
Bovino 08	09	12	75,00
Bovino 09	-	04	-
Bovino 10	10	85	11,76
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>656</b>	<b>6,40</b>

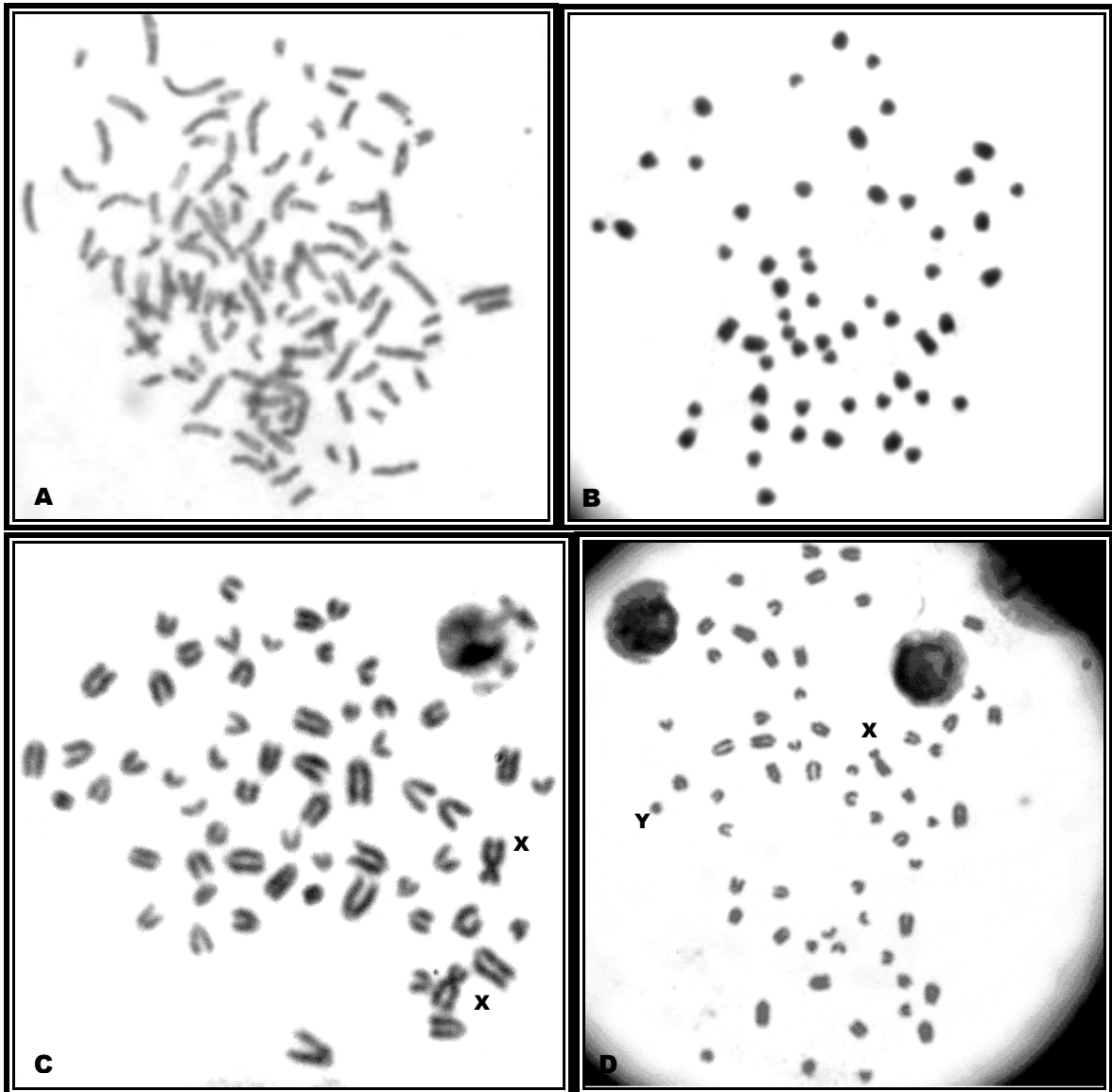


Figura 21. Classificação das metáfases com número diploide normal, aumentado (hiperploide) ou diminuído (hipoploide) quanto ao número de cromossomos, obtidos a partir da cultura de linfócitos do sangue periférico de bovinos: A) Bovino 03 mostrando célula com hiperploidia ( $2n = 116$ ); B) Bovino 02 apresentando célula com hipoploidia ( $2n = 53$ ); C) Bovino 10 exibindo metáfase normal de fêmea ( $2n = 60, XX$ ); D) Bovino 05 apresentando metáfase normal de macho ( $2n = 60, XY$ ).

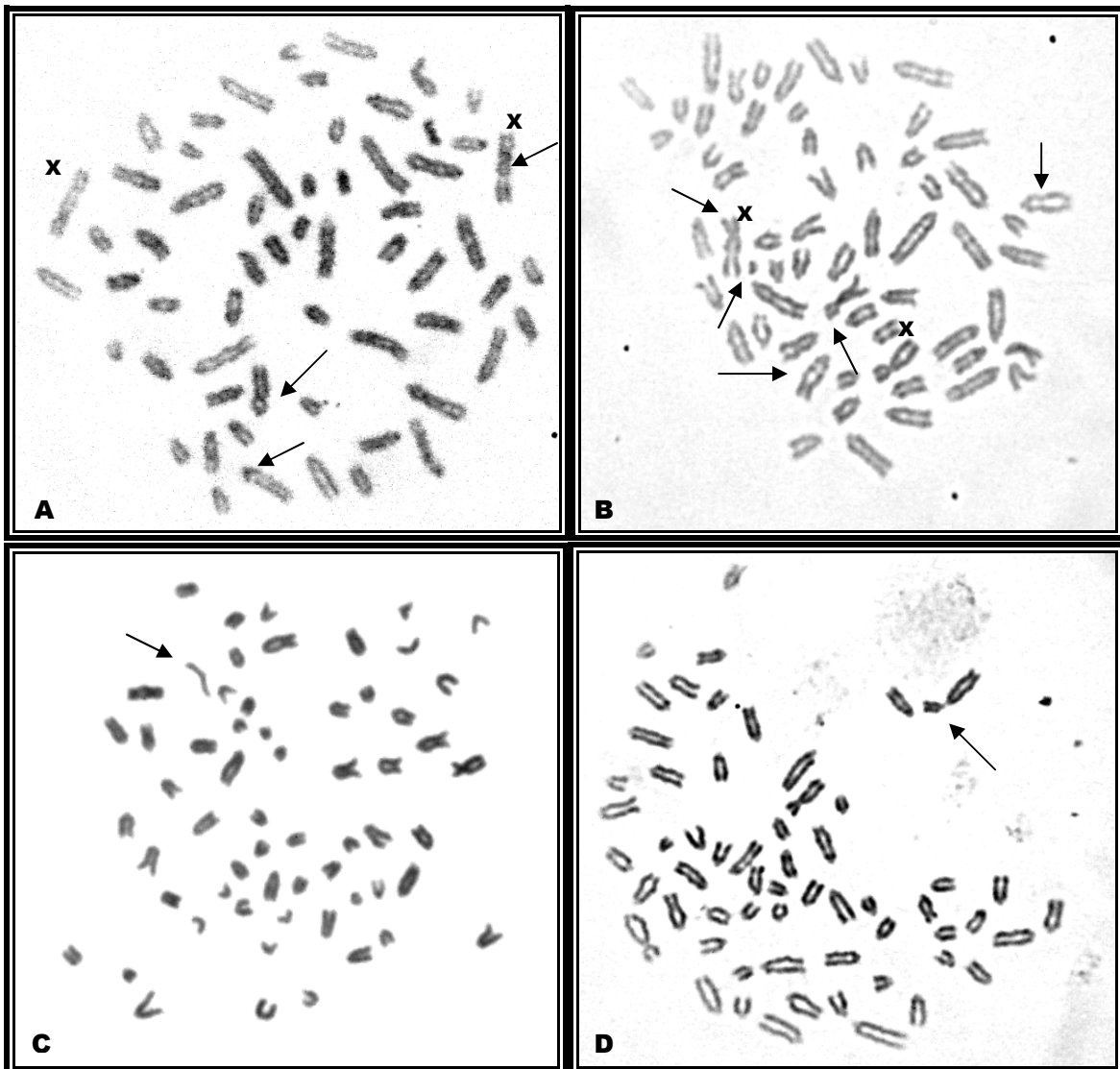


Figura 22. Aberrações estruturais na cultura de linfócito do sangue periférico de bovinos. As setas indicam possíveis lesões cromossômicas: A) Metáfase do bovino 08 com cromossomo sexual X apresentando fragilidade cromossomal e rearranjo cromossômico; B) Metáfase do bovino 08 com cromossomo sexual X apresentando gap e fusão cêntrica; C) Metáfase do bovino 10 apresentando cromátide aberta; D) Metáfase do bovino 06, a seta indica possível associação cêntrica.

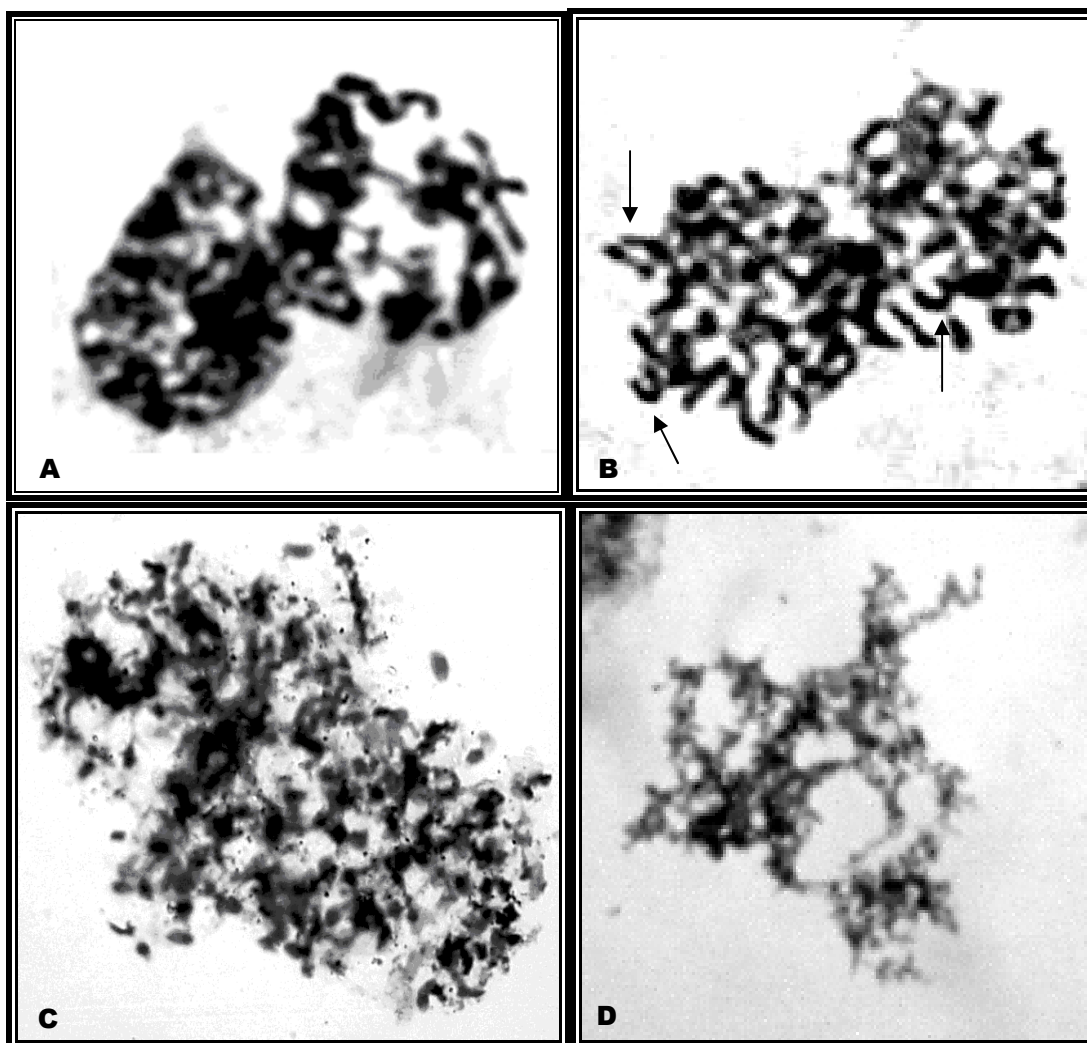


Figura 23. Condensação prematura dos cromossomos (PCC) na cultura de linfócito do sangue periférico de bovinos: A) Bovino 02 apresentando célula de PCC similar à prófase, B) Bovino 05 exibindo célula em fase G1 do PCC com cromossomos com uma cromátide, e fase G2 do PCC com cromossomos com duas cromátides; C) Bovino 09 com célula na fase S da divisão celular mostrando PCC com fragmentos cromossômicos pulverizados; D) Bovino 10 com célula em fase S do PCC com aparência pulverizada.

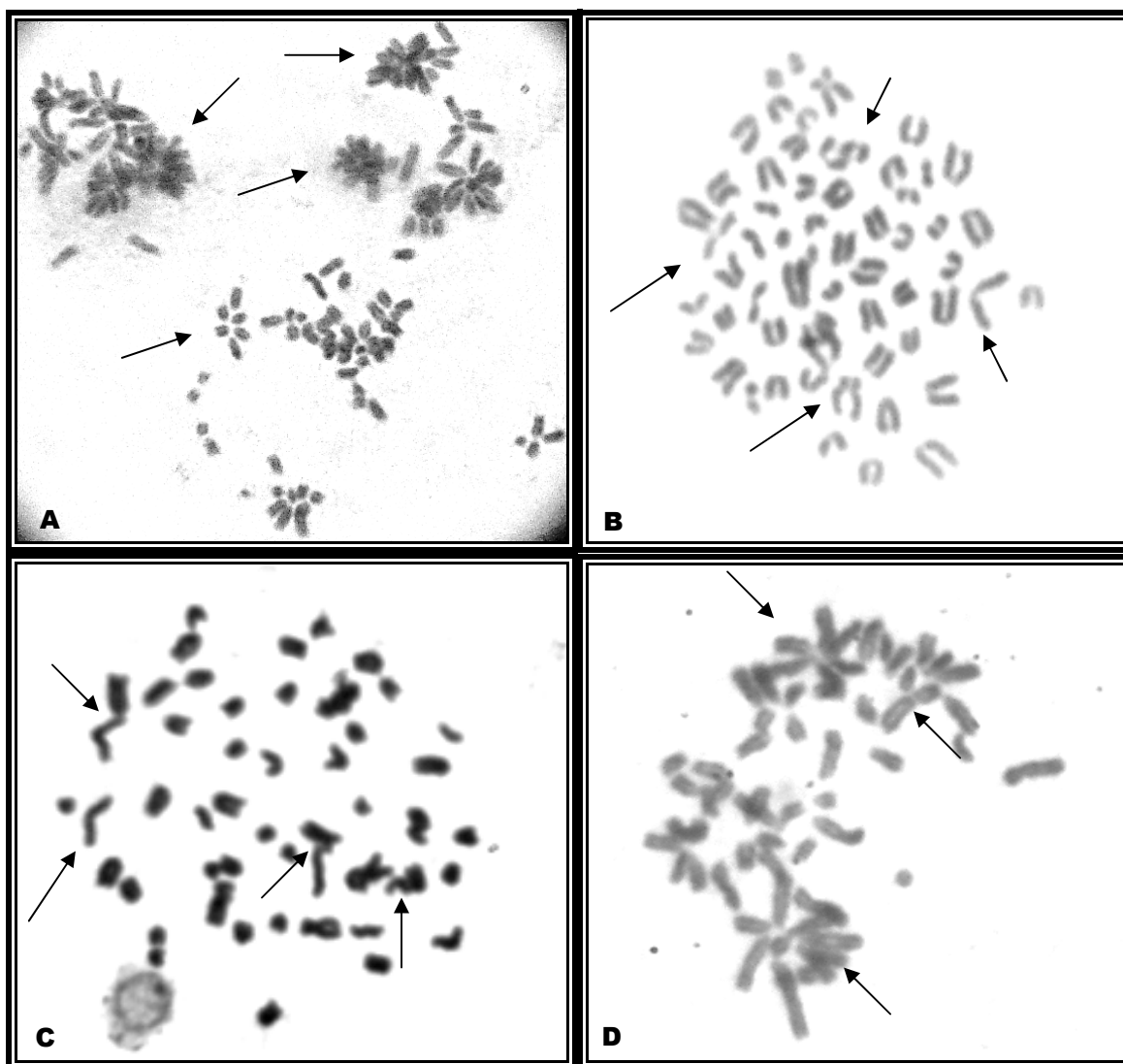


Figura 24. Rearranjos cromossômicos observados em análise citogenética de cultura de linfócitos de sangue periférico de bovinos. As setas indicam lesões sugestivas de: A) Metáfase do Bovino 05 apresentando associações cromossômicas; B) Metáfase do bovino 08 mostrando cromossomos com rearranjos (fusões cêntricas ou teloméricas) e cromátides abertas C) Bovino 10 com fusão do telômero com centrômero e fusão telomérica; D) Metáfase do bovino 02 com associação cromossômica e possível fusão cêntrica.

#### 5.2.1.2. Cultura das lesões cutâneas

Foram analisadas nas culturas de lesões cutâneas de 10 bovinos portadores clínicos de papilomatose, cerca de 1817 imagens similares à condensação prematura dos cromossomos na intérfase durante a divisão celular. Essas imagens evidenciavam diversos estágios de condensação de cromatina, onde, em algumas, a

cromatina não foi observada condensada. Em outras, foram observadas células com apenas uma cromátide por cromossomo, células exibindo duas cromátides por cromossomo e também foram observadas células mostrando aparência pulverizada (Figura 25).

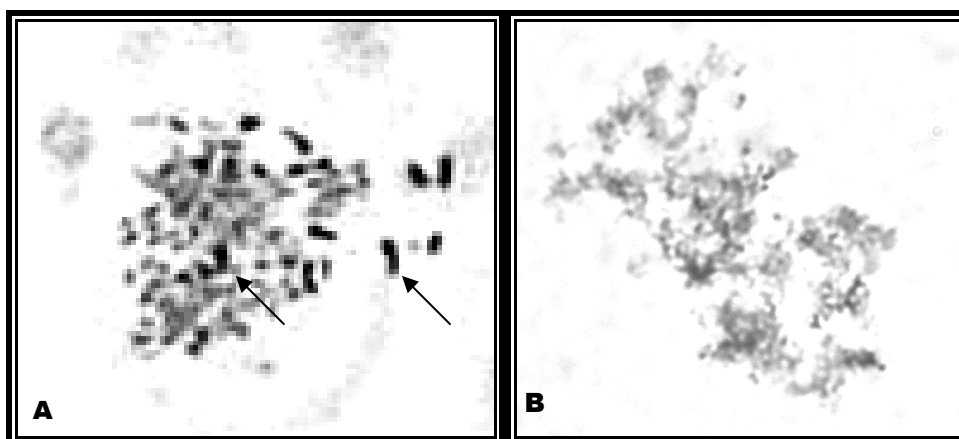


Figura 25. Estágios da condensação prematura dos cromossomos. As setas indicam lesões sugestivas de: A) Condensação prematura dos cromossomos, em célula do bovino 02, exibindo cromossomos com uma cromátide (fase G1-PCC) e com dupla cromátide (G2-PCC); B) Bovino 05 apresentando célula com morfologia pulverizada (fase S-PCC).

## 5.2.2. Análise cromossômica nos caninos

### 5.2.2.1. Análise das metáfases obtidas por cultura de linfócitos do sangue periférico

Foram encontradas nas culturas dos linfócitos do sangue periférico de três caninos apresentando lesões cutâneas, ao todo 549 células mitóticas foram classificadas quanto ao número de cromossomos, sendo: 48 completas, 161 com alterações numéricas, entre estas, 150 células com hipoploidia, 11 com hiperploídia e 340 células apresentando condensação prematura de cromossomos (Tabela 27).

As alterações numéricas classificadas como hipoploidia compreendem a ausência de um a 73 cromossomos por metáfase, sendo a maioria a perda de 10



cromossomos, e aquelas classificadas como hiperploídia representam a presença de três a 70 cromossomos adicionais por metáfase.

Tabela 27. Número de metáfases completas, com alterações numéricas e células com condensação prematura dos cromossomos (PCC), encontradas na cultura de linfócitos do sangue periférico de caninos com lesões cutâneas

Identificação	Completas (2n = 60)	Metáfases		PCC	Células
		Alterações numéricas			
		Hipoploidia	Hiperploídia		
Canino 01	30	89	08	-	127
Canino 02	18	61	02	50	131
Canino 03	0	0	01	290	291
<b>Total</b>	<b>48</b>	<b>150</b>	<b>11</b>	<b>340</b>	<b>549</b>

Foram encontradas, na cultura de linfócitos do sangue periférico de caninos, 15 células com anomalias cromossômicas estruturais (Tabela 28). As aberrações cromossômicas estruturais foram sugestivas de: cromátides abertas, anel, quebra cromossômica e fragmentos cromossômicos (Figura 26). Também foram encontradas morfologias da condensação prematura dos cromossomos similares à prófase, e outras células exibindo as fases G1, S e G2 da Intérfase do ciclo celular (Figura 27).

Tabela 28. Frequência das células analisadas com aberrações cromossômicas estruturais nos linfócitos do sangue periférico de caninos com lesões cutâneas

Identificação	Células		
	Com anormalidades cromossômicas	Total analisado	Com anormalidades cromossômicas (%)
Canino 01	08	119	6,72
Canino 02	07	81	8,64
Canino 03	-	01	-
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>201</b>	<b>7,46</b>

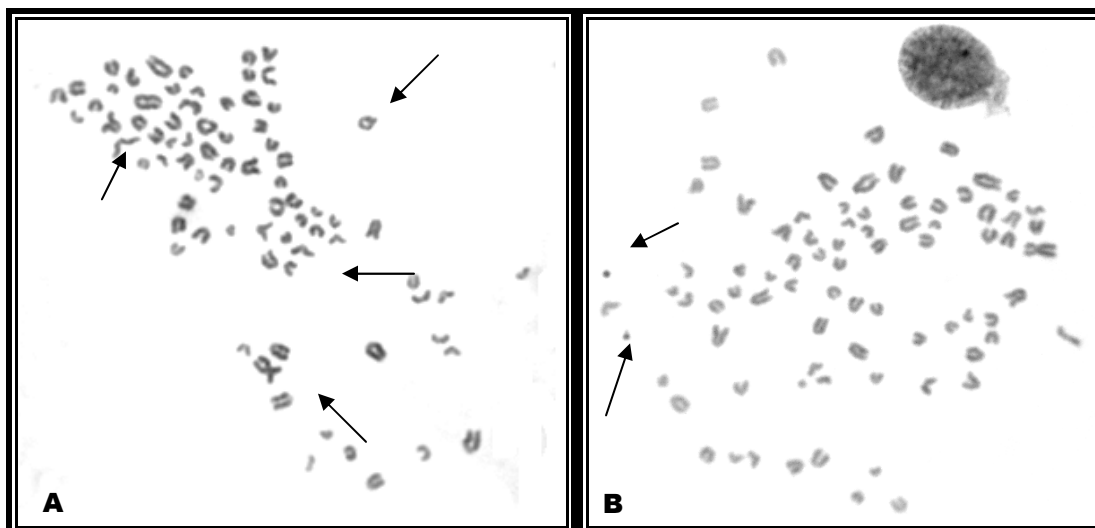


Figura 26. Anomalias cromossômicas observadas em metáfases obtidas a partir da cultura de linfócitos do sangue periférico de caninos. As setas indicam lesões sugestivas de: A) Canino 02 apresentando cromátides abertas, anel e quebra cromossômica; B) Canino 01 com fragmentos cromossômicos.

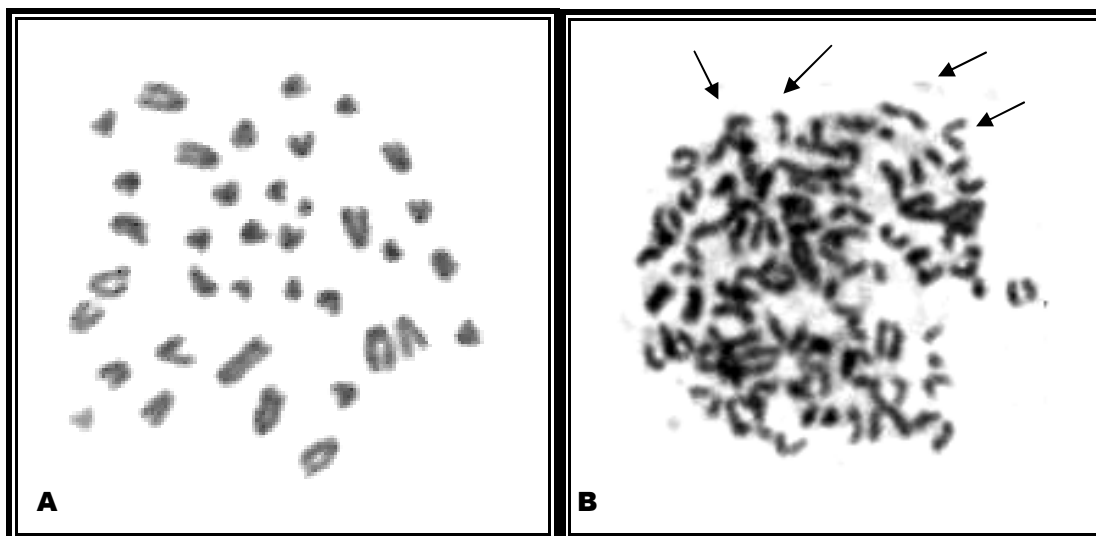


Figura 27. Célula hipoploide e morfologias dos cromossomos condensados prematuramente (PCC) na cultura de linfócitos do sangue periférico de caninos. As lesões cromossômicas são indicativas de: A) Canino 01 mostrando célula com hipoploidia ( $2n = 37$ ); B) Canino 02 apresentando célula, na fase G1, com apenas uma cromátide, e fase G2 do PCC com cromossomos com dupla cromátide.

### 5.2.3. Análise cromossômica nos equinos

#### 5.2.3.1. Análise das metáfases obtidas por cultura de linfócitos do sangue periférico

Foi encontrado, nas culturas dos linfócitos do sangue periférico de três equinos, portadores clínicos de papilomatose equina, um total de 123 células mitóticas classificadas quanto ao número de cromossomos, sendo: 30 completas, 50 com alterações numéricas e, entre estas, 46 células com hipoploidia, 04 com hiperploídia (Figura 28), e 43 células apresentando condensação prematura de cromossomos (Tabela 29).

As alterações numéricas classificadas como hipoploidia compreendem a ausência de dois a 55 cromossomos por metáfase, sendo a maioria com perda de dois cromossomos, e aquelas classificadas como hiperploídia representam a presença de quatro a 34 cromossomos adicionais por metáfase.

Tabela 29. Número de metáfases completas, com alterações numéricas e células com condensação prematura dos cromossomos (PCC), encontradas na cultura de linfócitos do sangue periférico de equinos com papilomatose.

Identificação	Completas (2n = 60)	Metáfases		PCC	Células
		Alterações numéricas			
		Hipoploidia	Hiperploidia		
Equino 01	6	2	-	7	15
Equino 02	4	11	01	8	24
Equino 03	20	33	03	28	84
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>46</b>	<b>04</b>	<b>43</b>	<b>123</b>

Foram encontradas, na cultura de linfócitos do sangue periférico de equinos, sete células com anomalias cromossômicas estruturais (Tabela 30). As aberrações cromossômicas estruturais foram sugestivas de: fusão cêntrica, cromátide aberta e associação de cromossomos. Também foram encontradas morfologias da condensação prematura dos cromossomos similares à prófase, e outras células exibindo as fases G1, S e G2 da intérfase do ciclo celular.

Tabela 30. Frequência das células analisadas com aberrações cromossômicas estruturais nos linfócitos do sangue periférico de equinos com papilomatose

Identificação	Células	
	Com anormalidades cromossômicas	Com anormalidades cromossômicas
Equino 01	-	08
Equino 02	02	16
Equino 03	05	56
<b>Total</b>	<b>07</b>	<b>80</b>

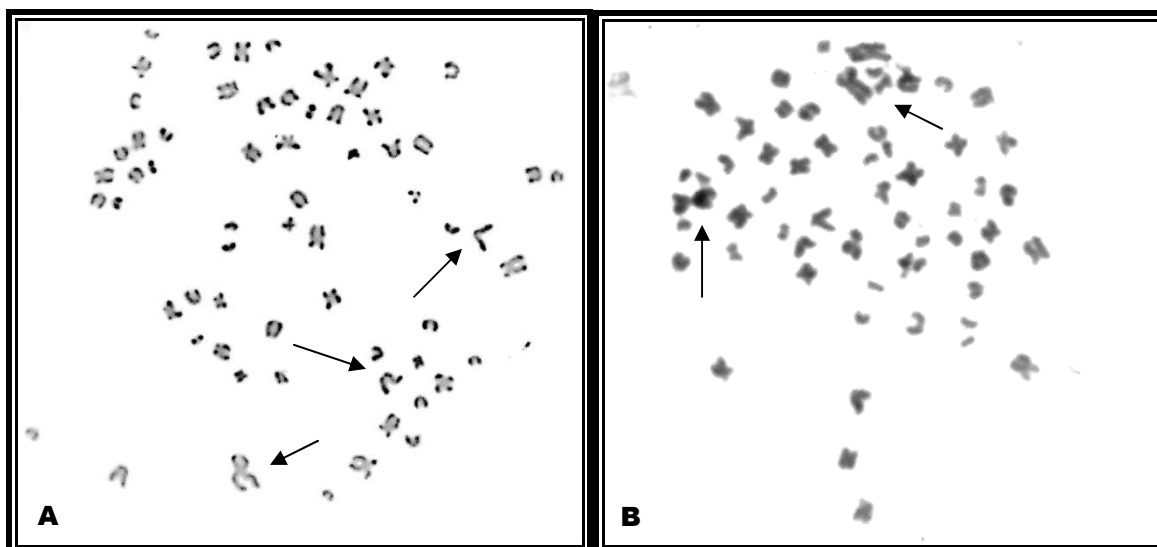


Figura 28. Alterações numéricas e estruturais nos cromossomos, obtidos a partir da cultura de linfócitos do sangue periférico de equino. As setas indicam lesões cromossômicas sugestivas de: A) Metáfase do equino 03, apresentando metáfase com fusão cromossômica e cromátide aberta; B) Metáfase do equino 03, com fusão cêntrica.

#### 5.2.4. Técnicas de bandamento cromossômico

Nas metáfases analisadas de cada espécie, não foi possível observar nitidamente os padrões cromossômicos de bandamento G. Pelo método de bandamento C, não foi identificada marcação evidente da heterocromatina constitutiva da região centromérica dos cromossomos autossomos e sexuais dos animais investigados.

#### 5.2.5. Análise estatística dos dados citogenéticos

Ao analisar as amostras colhidas, verificou-se que, entre as metáfases, a média de proporção de células completas com número diploide de cromossomos nos bovinos é  $28,68\% \pm 16,12\%$  (C.V=0,56) e, em média, 71,31% das células apresentaram alterações numéricas com desvio padrão de 16,12% (C.V=0,23). Pelo teste de Wilcoxon, concluiu-se que as diferenças entre os percentuais de células completas e as alterações numéricas dos bovinos não são significativamente diferentes ( $p$ -valor=0,007). Quando divididas, as células em hipoploides (em média,

67,29%±16,06) e hiperploides (em média, 4,02%±4,04), ao compararmos as proporções de células completas hipoploides e hiperploides pelo teste de Friedman, concluiu-se que há diferenças significativas entre os percentuais de células completas, hipoploides e hiperploides nos bovinos (p-valor=0,000). Quando considerado o total de células analisadas na cultura dos linfócitos, temos o percentual médio das metáfases de 64,08%± 26,15% (C.V=0,41) e a proporção média de PCC de 35,92%± 26,15% (C.V=0,73). Pelo teste de Wilcoxon, verificou-se que, nos bovinos, as diferenças entre as proporções médias de metáfases e PCC não são significativas, com p-valor igual a 0,173.

Além da contagem de PCC nos linfócitos, para os bovinos, também foi avaliada a contagem de PCC nas lesões. A quantidade de PCC nos linfócitos independe da quantidade de PCC nas lesões, uma vez que não se verifica algum tipo de correlação entre as duas variáveis. O número médio de células PCC nos linfócitos foi de 27,60± 33,38 (C.V=1,21), enquanto a média de PCC encontrada nas lesões foi de 181,70± 190,33 (C.V=1,05). A diferença entre o número de PCC nas lesões e nos linfócitos é significativa, p-valor do teste de Wilcoxon igual a 0,005.

Ao observar o grupo dos cães, verificou-se que, em média, 15,28%±13,31% (C.V=0,87) das metáfases eram completas e 84,72%±13,31% (C.V=0,16) eram alterações numéricas. Dentre as células com alterações numéricas, em média, 48,46% eram hipoploides e 36,26% eram hiperploides. No total de células avaliadas, comparando o percentual de metáfases com o percentual de PCC dos caninos, em média, 54,06%±50,28% (C.V=0,93) eram metáfases e 45,94%±50,28% (C.V=1,09) eram PCC.

Ao observar os grupos dos equinos, verificou-se que, em média, 45,24%±26,33% (C.V=0,58) das metáfases eram completas e 54,76%±26,33% (C.V=0,48) eram alterações numéricas. Dentre as alterações numéricas, as células hipoploides apresentaram em média 50,89%±22,96% (C.V=0,45), e as células hiperploides, 3,87%±3,38% (C.V=0,87). Comparando os totais de células avaliadas no estudo, verificou-se que o percentual médio de metáfases encontradas foi de 62,22%±7,70% (C.V=0,12) e, em média, 37,78%±7,70% (C.V=0,20) eram de PCC.

Para os bovinos, caninos e equinos, o percentual médio de células com alterações numéricas (hipoploides e hiperploides) encontrado é maior do que o percentual médio de células completas, com predominância de células hipoploides.

O grupo dos equinos foi o que apresentou maior proporção de células completas (média  $45,24\% \pm 26,33\%$ ) (C.V=0,58); os bovinos apresentaram maior proporção de células hipoploides (média  $67,29\% \pm 16,06\%$ ) (C.V=0,24); e os caninos se destacaram como o grupo que obteve maior percentual médio de células hiperploides ( $36,26\% \pm 55,24\%$ ) (C.V=1,52) (Figura 29).

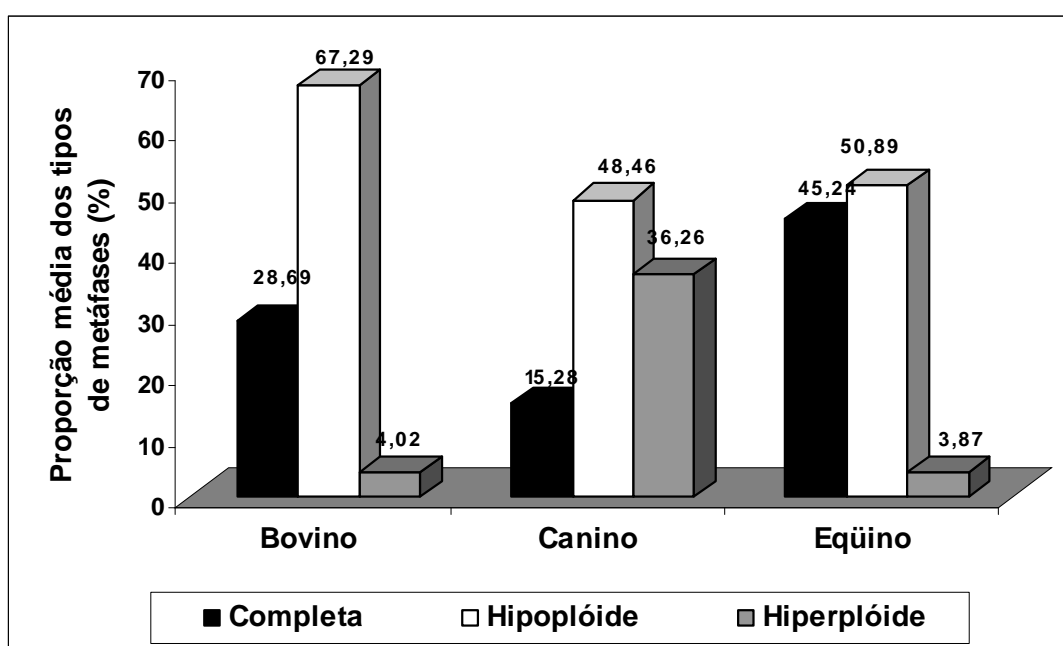


Figura 29. Proporção média dos tipos de metáfases nos grupos animais.

Ao comparar a proporção média de metáfases com a proporção média de PCC encontradas nos linfócitos, verifica-se que, nos bovinos, caninos e eqüinos, o percentual médio de metáfases foi maior que o percentual médio de PCC, sendo este percentual médio de metáfase maior nos bovinos (64,08%) (Figura 30).

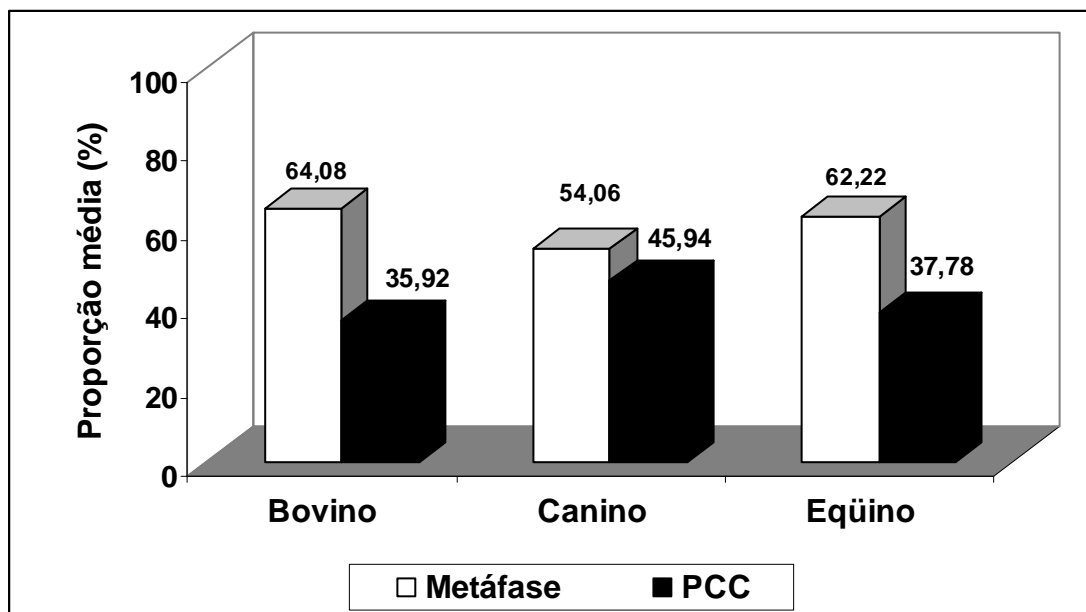


Figura 30. Proporção média de metáfases e PCC nos grupos animais.

Sob o ponto de vista estatístico, pode-se afirmar que, no grupo dos bovinos estudados, há diferença significativa entre as médias de proporções de células completas (diploides) e incompletas (haploides) ( $p$ -valor=0,007); não há diferença significativa entre as proporções médias de células de metáfase e os PCCs ( $p$ -valor=0,173); há diferença significativa entre a contagem de PCCs nas lesões e PCCs nos linfócitos ( $p$ -valor=0,005) (Tabela 31). Por sua vez, não há uma correlação entre as contagens de cromossomos prematuros em ambas as culturas de linfócitos periféricos e culturas das lesões cutâneas, sendo, portanto, variáveis independentes. Não foram feitos testes de significância para comparar grupos envolvendo os caninos e equinos, devido aos tamanhos amostrais pequenos destes grupos.



Tabela 31. Características citogenéticas dos grupos estudados.

<b>Espécies</b>	<b>Células diploides (%)</b>	<b>Células hipoploides (%)</b>	<b>Células hiperploides (%)</b>	<b>Aberrações numéricas (%)</b>
Bovino	28,68 ± 16,12	67,29 ± 16,06	4,01 ± 4,04	71,31 ± 16,12
Canino	15,28 ± 13,31	48,46 ± 42,05	36,31 ± 55,23	84,71 ± 13,31
Equino	45,23 ± 26,32	50,89 ± 22,95	3,86 ± 3,38	54,76 ± 26,32

### 5.3. Histopatologia

Das 18 amostras examinadas microscopicamente, em 12 (66,66%), foi diagnosticada a papilomatose, abrangendo os bovinos e o primata; em três (16,66%), foram diagnosticadas como adenocarcinomas, provenientes das lesões caninas; em uma (5,55%), foi diagnosticada como formações nodulares da arara; em uma (5,55%), proveniente da colheita do porco selvagem, coube o diagnóstico de melanoma; e, por último, em uma (5,55%), o diagnóstico foi de epúlide fibromatosa, da mucosa oral de leão (Tabela 32).

O exame microscópico de lesões papilomatosas cutâneas mostrou alterações representadas por acentuada hiperplasia do estrato espinhoso (acantose), associada à hiperqueratose, ora paraqueratótica com evidência dos núcleos, ora ortoqueratótica, com ausência nuclear; e hipergranulose, pela exacerbação do estrato granuloso (com abundância de grânulos querato-hialinos). Evidenciaram-se também coilócitos e corpúsculos de inclusão viral. O estroma, escasso e variavelmente infiltrado por células linfoplasmocitárias com predominância dos linfócitos, emitia projeções papiliformes. A lesão papilomatosa oral no primata, vista ao microscópio óptico, com coloração de hematoxilina e eosina (micro/H&E), revelou acantose, escassa hiperqueratose, raros coilócitos e suporte papilífero irregularmente infiltrado por linfócitos e plasmócitos. Impressionou a ausência de granulose. A histopatologia, em amostras de lesões úlcero-crostosas dos caninos, revelou, ao micro/H&E, hiperqueratose, infiltrado inflamatório de mononucleares, proliferação de adenomas sebáceos, exibindo, algumas vezes, graus de degeneração e formações císticas com presença de pérolas córneas. Ao conjunto,

perimitiu-se o diagnóstico de adenocarcinoma. A Tabela 32 exhibe os números de casos encontrados suspeitos para lesão clínica da papilomatose e diagnóstico histopatológico das dermatopatias.

Tabela 32. Casuística de acordo com o diagnóstico histopatológico das dermatopatias

<b>Espécie</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Número de Casos (n)</b>	<b>Frequência (%)</b>
<i>Bos taurus</i>	Papilomatose cutânea	11	61,11
<i>Macaca fascicularis</i>	Papilomatose oral	1	5,55
<i>Canis familiaris</i>	Adenocarcinoma	3	16,66
<i>Ara ararauna</i>	Formação Nodular	1	5,55
<i>Sus scrofa</i>	Melanoma	1	5,55
<i>Panthera leo</i>	Epúlide fibromatosa	1	5,55
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>18</b>	<b>100</b>

Os grupos I e II foram divididos, baseados no diagnóstico histopatológico. No grupo I, foram incluídos os 12 (66,66%) casos diagnosticados como papilomatose e, no grupo II, os 6 (33,33%) casos das outras dermatopatias entre espécies diferentes. Dos 12 animais incluídos no grupo I, sete (58,33%) eram fêmeas e cinco (41,66%) eram machos, com idade variando de cinco meses a cinco anos para os bovinos, e 15 anos para o primata. Quanto à forma das lesões, quatro (33,33%) eram sésseis, planas e achatadas, seis (50%) eram pedunculares e exibiam aparência de “couve-flor” e duas (16,66%) eram lesões mistas, apresentando ambas as formas. Em 75%, a maior parte delas (9/12) localizava-se na região do dorso, 50% (6/12) na região da barbela, 41,66% (4/12) na região do pescoço, 16,66% (2/12) na região dos membros e abdômen; e 8,33% (1/12) na região ventral, nasal e mucosa oral.

No grupo II, três (50%) eram machos, dois (33,33%) eram fêmeas e um não houve determinação sexual. Três casos (50%) apresentavam a forma plana da lesão; em dois (33,33%), foram observadas tanto a forma peduncular quanto à

plana, e um (16,66%) apresentava a forma peduncular da lesão. Em dois (33,33%) casos, a lesão localizava-se na mucosa, sendo um (16,66%) na mucosa oral e o outro (16,66%) na mucosa cloacal. Em três (50%) casos, a lesão apresentava-se preferencialmente na região nasal e, em dois (33,33%), nos membros posteriores. Tais alterações são contributivas do ponto de vista clínico-morfológico e apresentadas pelas Figuras 31 e 32, que mostram as alterações nos cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H&E), diagnosticadas como papilomatose cutânea bovina e papilomatose na mucosa oral de primata.

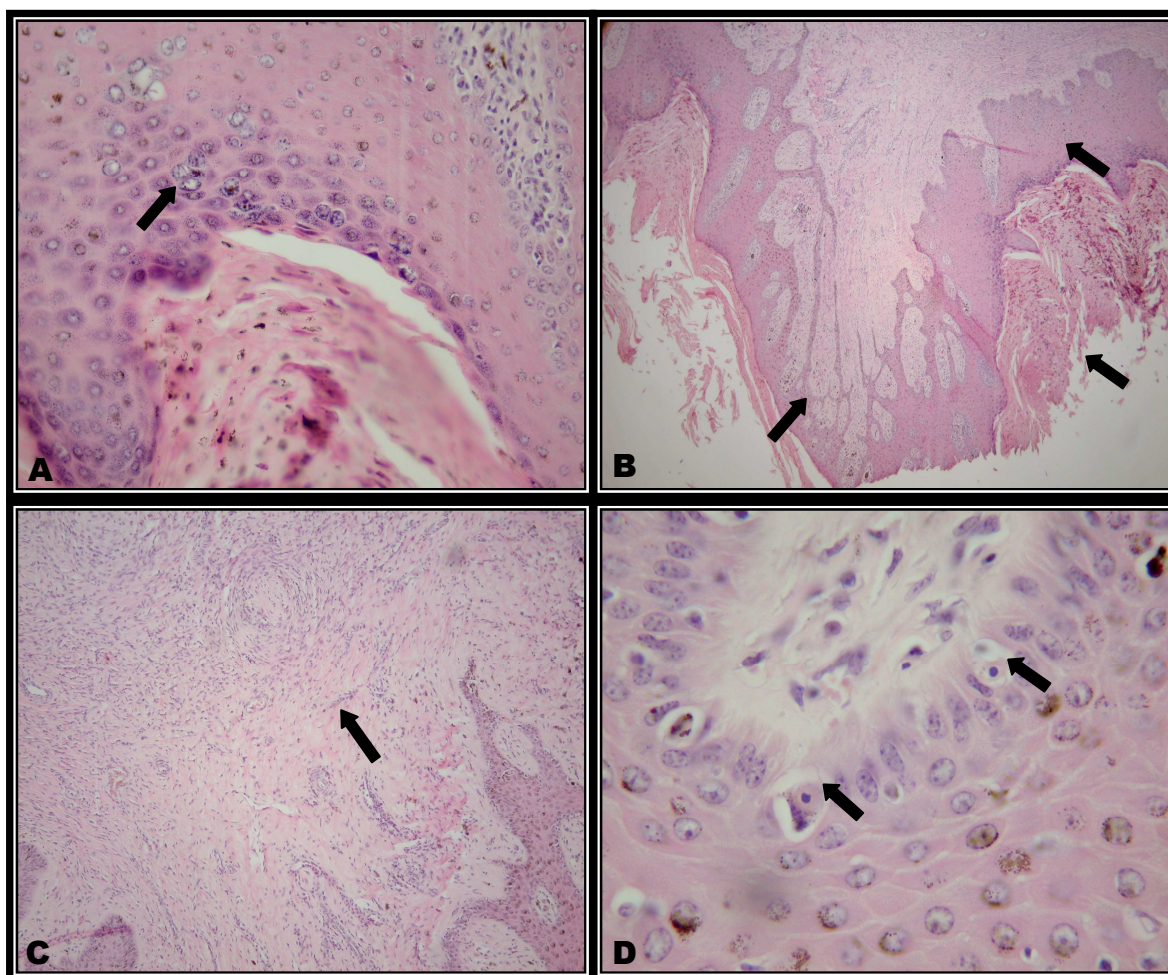


Figura 31. Alterações histológicas da papilomatose cutânea em bovino, H&E. As setas indicam: A) Grânulos querato-hialinos na junção dermo-epidermal. Obj. 40x, B) Formação de cristas interpapilares, presença de acantose e hiperqueratose, Obj. 10x; C) Proliferação de tecido conjuntivo característico do fibropapiloma. Obj. 10x; D) Corpúsculo de Inclusão Intranuclear basofílico. Obj. 40x.

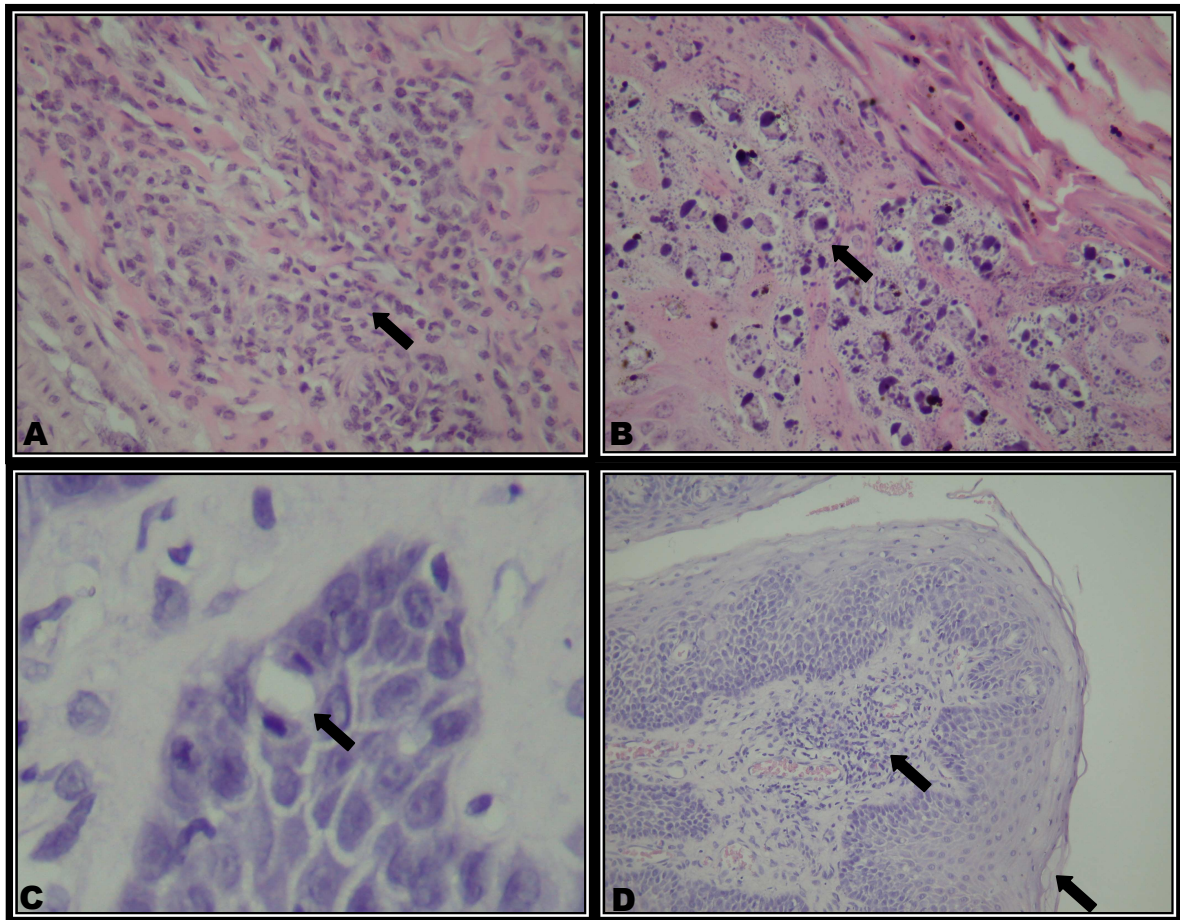


Figura 32. Alterações histológicas da papilomatose cutânea bovina (A e B) e papilomatose da mucosa oral de primata (C e D), H&E. As setas indicam: A) Estroma infiltrado por células linfoplasmocitárias com predomínio dos linfócitos. Obj. 40x. B) Hiperqueratose e hipergranulose devido à exacerbação do estrato granuloso pela formação de granulações. Obj. 10x. C) Célula basal vacuolizada em divisão celular compatível com o início da replicação viral. Obj. 40x; D) Escassa hiperqueratose evidenciando o eixo conjuntivo por linfócitos e plasmócitos. Obj. 40x.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Análise molecular

Pela diversidade de espécies estudadas, e pela padronização da técnica já estabelecida para a pesquisa do PV voltada especificamente para os bovinos, tomou-se como base os parâmetros moleculares do gene L1, de interesse do capsídeo viral.

Freitas et al. (2003, p. 76) detectaram sequências de DNA de BPV-1 em amostras de verrugas, sangue e plasma de bovinos afetados pela papilomatose. Entretanto, em algumas amostras de plasma, não foram detectadas sequências do DNA de BPV-1. Similar às amostras de plasma da nossa pesquisa, apenas foi detectado DNA genômico viável em uma amostra de búfalo. A análise molecular pela reação de PCR não prosseguiu, excluindo a espécie *Bubalus bubalis* do estudo.

A reação de PCR, utilizada no presente trabalho, condiz com os dados moleculares na literatura ao empregar *primers* genéricos que amplificam o gene L1, região mais conservada e estável do genoma viral entre todos os tipos de PV. O par de *primers* genéricos, direcionado ao gene de interesse, foram os degenerados FAP59/FAP64, desenhados por Forslund et al. (1999), também aplicados nas pesquisas de Ogawa et al. (2004, p. 2191), para detectar tumores cutâneos dos tipos de HPV e amostras de pele normal. Seguindo a metodologia proposta por Antonsson e Hansson (2002) e Ogawa et al. (2004, p. 2191), a principal estratégia, para a identificação dos tipos de PV presentes, tem sido a amplificação parcial do gene L1 do PV de origem humana e origem animal. Estas estratégias têm utilizado iniciadores degenerados para a amplificação por PCR, capazes de identificar não apenas os tipos virais já descritos, como também, detectar prováveis novos tipos virais em humanos e em espécies animais (CLAUS et al., 2007, p. 317).

Estes *primers* são denominados degenerados por conterem uma mistura de bases complementares em posições diversas, o que confere a possibilidade de detecção de inúmeros tipos de PV. Entretanto, este sistema resulta em grande variação das sequências de DNA, de acordo com o tipo de PV e tamanho do fragmento amplificado. Sendo assim, o par de *primer* FAP59/FAP64 foi escolhido previamente, uma vez que Ogawa ECT al. (2004) detectaram maior sensibilidade

quando comparado ao par de *primers* MY09/MY11, ambos utilizados para investigar a presença do PV nos espécimes de papilomas de bovino e em amostras de *swabs* de pele íntegra. Este último par de oligonucleotídeos tem sido amplamente empregado para amplificar o gene L1 da maioria dos tipos de HPV da mucosa genital.

Por sua vez, os *primers* tipo-específicos possuem maior especificidade na detecção do DNA viral e são geralmente dirigidos à região do gene E6 e E7, como também para os genes do capsídeo viral. Estes servem também como uma opção para confirmar os resultados obtidos a partir dos *primers* genéricos. Entretanto, tanto os iniciadores degenerados como os específicos têm sido utilizados, de modo geral, na pesquisa do PV em amostras epiteliais de papilomas e em amostras do tecido cutâneo íntegro. Neste trabalho, os *primers* degenerados foram empregados tanto em espécimes de tecido lesionado como também no sangue total de animais clinicamente sadios.

No presente trabalho, os achados em amostras caninas apresentam concordância com os dados de Tanabe et al. (2000), ao identificarem sequências de DNA viral em amostras cutâneas de caninos, e estão de acordo com Claus et al. (2007, p.314), ao obterem fragmentos amplificados a partir de papilomas de bovinos. Outros pesquisadores, como, Antonsson e Mc Millan (2006, p. 3195) e Maeda et al. (2007, p.244) detectaram a presença de DNA de PV utilizando o mesmo par de *primers* genéricos FAP59/FAP64 aplicado no presente estudo, a partir de amostras de *swabs* de epitélios saudáveis de animais australianos e verrugas da teta de vacas, respectivamente. Contudo, nos estudos de Antonsson e Mc Millan (2006) e Maeda et al. (2007), foram construídos novos pares de iniciadores. Na pesquisa de Antonsson e Mc Millan (2006, p. 3196), cinco novos tipos prováveis de PV animal foram identificados pelo sistema de clonagem dos produtos de PCR e, posteriormente, sequenciados com o mesmo par de iniciadores dianteiros e reversos. Somando-se ainda, novo par de *primer* tipo-específico foi desenhado para os novos suspostos tipos de Koala PV detectados. Estes novos iniciadores foram desenhados usando os *primers* degenerados, obtendo-se KoPVFAP59 (dianteiro) e KoPVFAP64 (reverso).

Maeda et al. (2007, p. 243), por sua vez, desenharam novo par de iniciadores, baseados na identidade da sequência de nucleotídeos a partir do gene L1, a maior proteína do capsídeo na montagem da partícula viral infectante.

Estes iniciadores foram delineados em dois subgrupos, sendo, no subgrupo A, a amplificação de sequências do BPV-1, BPV-2 e BPV-5, e, no subgrupo B, a detecção dos BPV-3, BPV-4 e BPV-6. Por outro lado, Mello (2005), na tentativa de obter uma intensificação do sinal produzido pelas amostras amplificadas, empregou nova estratégia molecular com a realização da técnica de *Nested* PCR, mas, sem obtenção de sucesso.

Alguns autores, como Maeda et al. (2007, p. 244), que não obtiveram sequências satisfatórias em algumas de suas amostras analisadas, purificaram seus produtos de PCR e os clonaram. Até 10 clones de cada produto de PCR foram isolados e novamente sequenciados. Situação semelhante ocorreu no presente estudo, quando algumas sequências apresentaram picos de ruído de fundo na análise do eletroferograma, entretanto, a aplicação da técnica de clonagem não estava disponível no laboratório. Nos estudos de Mello (2005, p. 80), mesmo após a clonagem e o sequenciamento com sequências satisfatórias para análise por alinhamento de nucleotídeos, não foi possível a comparação com sequência compatível com DNA de PV referenciada no banco de dados, mostrando a dificuldade em estudar este vírus.

A partir da associação do PV com as neoplasias malignas, sejam do tecido cutâneo ou de mucosa, diagnosticadas em lesões do carcinoma epidermoide, câncer do colo uterino e carcinoma oral em humanos, optou-se por investigar o PV nas amostras sanguíneas e nas lesões malignas do tecido cutâneo dos caninos.

Detectou-se amplificação do DNA viral na biópsia de pele de bovinos portadores clínicos da papilomatose. As amostras sanguíneas, oriundas dos mesmos animais, não apresentaram bandas amplificadas na PCR. Tal fato induz a hipótese de o genoma viral estar integrado à célula hospedeira, uma vez que as sequências do gene L1 foram rompidas ou o PV estava presente com cópias de DNA inferiores aos níveis detectáveis e não foram lidos pelos *primers* utilizados. De Villiers (2001 apud MELLO, 2005, p. 84) acredita ser impossível o desenvolvimento de um iniciador capaz de amplificar todos os tipos de PVs existentes com igual sensibilidade e especificidade. Com isso, algumas amostras de animais no presente estudo apresentaram bandas duplas. Resultados muito similares foram obtidos nos estudos de Mello (2005, p. 75), ao detectar múltiplas bandas com diferentes tamanhos de fragmentos em bp, visualizadas nos géis da pesquisa com macacos não-portadores da papilomatose, mostrando que as condições de PCR adotadas

foram parcialmente inadequadas para as amostras em estudo, e que tais condições devem ser modificadas até que se obtenha somente a amplificação do produto desejado.

Rector et al. (2004, p. 12699) detectaram sequências de DNA de PV em biópsias de lesões cutâneas de “peixe-boi” da espécie *Trichechus manatus latirostris*, utilizando o mesmo par de *primers* degenerados empregado no presente estudo e nas mesmas condições de PCR aqui descritas. Contudo, só foi possível a caracterização do DNA genômico completo do novo PV, no estudo de Rector et al. (2004, p. 12699), usando um protocolo de amplificação com múltiplos *primers* (*multiply primed rolling-circle amplification* – RCA). Tal metodologia foi otimizada em seu estudo posterior (Rector et al., 2005, p. 450), utilizando lesões cutâneas de “porquinho-da-Índia” da espécie *Erethizon dorsatum* (Ed). Ao clonar os fragmentos resultantes do produto de RCA e, posteriormente, sequenciá-los foi possível caracterizar geneticamente o genoma completo do EdPV-1. Recentemente, um novo PV foi isolado a partir de lesões papilomatosas na mucosa oral do urso polar (*Ursus maritimus*), utilizando a técnica de restrição enzimática do produto de RCA e posterior clonagem para caracterização do genoma completo *Ursus maritimus papillomavirus type 1* (UmPV-1) (STEVENS et al., 2008).

No Brasil, a primeira investigação da ocorrência de PV em esfregaços genitais de primatas não-humanos, do Novo Mundo, foi tema da tese de Doutorado desenvolvida em colaboração com o Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer – ILPC, sob orientação da Dra. Luísa Lina Villa e defendida por Wyller Alencar de Mello, em 2005. A população avaliada envolveu 16 espécies de oito gêneros diferentes de macacos da fauna americana: *Callithrix*, *Aotus*, *Cebus*, *Saimiri*, *Chiropotes*, *Saguinus*, *Callicebus* e *Alouatta*, todos mantidos em cativeiro no Centro Nacional de Primatas, no estado do Pará. Em tal pesquisa, foram analisadas amostras da mucosa genital de 306 animais, utilizando a técnica de PCR com os iniciadores consensuais MY09/MY11, capazes de amplificar um fragmento do gene L1 de um amplo espectro de PV. Os resultados obtidos na pesquisa de Mello (2005, p. 75) não revelaram evidências de positividade nos espécimes dos primatas investigados, sugerindo que os mesmos não possuem sequências de PV, em contraste com a descrição de PV em determinadas espécies de macaco do Velho Mundo. A hipótese da ligação evolucionária entre os primatas e os PVs, admitida em alguns estudos, não é sustentada pelos dados gerados nesta pesquisa.



Na presente pesquisa, detectaram-se 31,03% das amostras sanguíneas e 48,14% das amostras de lesões teciduais, sendo a primeira pesquisa no Brasil referente a estudos da infecção assintomática pelo PV em espécies animais bem diversificadas, dentre domésticas e silvestres.

A pesquisa do PV tem sido, geralmente, realizada a partir da detecção de sequências de DNA viral em amostras de papilomas de bovinos (OGAWA et al., 2004; CLAUS et al., 2007), lesões orais de animais silvestres (SUNDBERG et al., 1996; STEVENS et al., 2008), *swabs* epiteliais íntegros de animais australianos (ANTONSSON e McMILLAN, 2006) e *swabs* da mucosa genital de primatas não-humanos (MELLO, 2005). A presente tese investigou, principalmente, as amostras sanguíneas de espécies animais da fauna brasileira com e sem manifestação clínica da infecção pelo PV, o que ainda não havia sido pesquisado.

Segundo dados de Ogawa et al. (2004), ao pesquisarem amostras de *swab* da teta de vacas clinicamente sadias, detectaram, em 17,22% das amostras, sequências de DNA do BPV utilizando os *primers* degenerados FAP59/FAP64, e 6,55% das amostras apresentaram-se positivas para a infecção viral com o par de *primers* MY09/MY11. Comparando com os dados encontrados neste trabalho, pela análise molecular, verificou-se que 31,03% (18/58) das amostras sanguíneas dos animais clinicamente sadios e 48,14% (13/27) das amostras dos animais com lesões da papilomatose apresentaram sequências de DNA viral sugestivas da infecção pelo PV, utilizando os *primers* FAP59/FAP64.

Apesar dos recentes estudos das papilomatoses aviárias, somente no passeriforme *Fringilla coelebs* e no papagaio cinza africano, *Psittacus erithacus timneh*, foram detectadas sequências de DNA do PV por Terai et al. (2002, p. 10020) e Moreno-Lopes et al. (2004, p. 872), a partir de amostras de papilomas escamosos. Entretanto, na presente pesquisa, verificou-se que as sequências de DNA de PV foram amplificadas a partir de amostras de sangue de aves clinicamente saudáveis de espécies ainda não estudadas, como *Ara chroptera*, conhecida comumente como “arara vermelha”, e *Ara macao*, conhecida como “araracanga”, ambas do gênero *Ara*, e *Struthio camelus*, conhecido como avestruz da raça African Black.

De acordo com relatos prévios na literatura, a infecção viral ocorre quando o DNA do PV em sua forma epissomal (circular) reside no núcleo das células basais. Mecanismos de imunossupressão ativam o genoma viral a se tornar linear com a abertura das ORFs E1 e E2, e a se integrar ao cromossomo da célula hospedeira,

dando início à replicação viral. Entretanto, os mecanismos envolvidos na conversão da infecção “latente” para a infecção “produtiva” não estão bem elucidados (MELLO, 2005; CAMPO et al., 1994).

O estudo da “latência” viral foi abordado em pesquisas como as de Antonsson e McMillan, (2006, p. 3195), ao estudarem diversas espécies de animais australianos a partir de amostras de *swabs* de pele para aplicação da técnica de PCR, utilizando o mesmo par de iniciadores, FAP59/FAP64, para detecção do DNA de PV. No presente trabalho, por ter sido investigada a infecção viral a partir de amostras do sangue total, acredita-se que a não-amplificação, em algumas amostras, deve-se à presença do PV em limites abaixo de detecção, ou o PV presente não foi detectável pela utilização de *primers* voltados para a análise na região amplificadora L1, havendo deleções do gene da “amostra teste”, com perda de material cromossômico. Ressalta-se ainda que os estudos da infecção pelo PV em sua forma epissomal têm sido realizados apenas com amostras íntegras a partir de *swabs* epiteliais e não pela amostra sanguínea.

Pela técnica de PCR, optou-se pela não-inclusão das amostras histopatológicas emblocadas em parafina por, geralmente, conterem baixo número de cópias de DNA viral. Com isso, selecionaram-se, exclusivamente, amostras sanguíneas e fragmentos de tecidos congelados para a detecção do DNA viral. Comparando os resultados obtidos em amostras de sangue de animais clinicamente saudáveis com os resultados de Ogawa et al. (2004, p. 2191), que detectaram sequências de DNA viral em amostras de *swab* de pele íntegra das tetas de vacas, utilizando a técnica de PCR e com o mesmo par de iniciadores, ambos revelaram a infecção viral assintomática ou a forma subclínica da virose. Alguns autores registraram também a infecção viral na pele saudável de humanos e outros animais (ANTONSSON e McMILLAN, 2006).

O produto parcialmente amplificado, utilizando *primers* para o gene L1 na pesquisa do PV, revelou fragmentos de diferentes tamanhos em bp nas amostras de sangue de acordo com a espécie investigada, assim como a posição dos nucleotídeos variou de acordo com as amostras das espécies sequenciadas. Comparando com os estudos de Gonzáles et al. (1999 apud MELLO, 2005, p. 57), múltiplas bandas em diversos tipos de PV foram amplificadas. Tomando-se por base a pesquisa do genoma completo do COPV, segundo Nicholls et al., (1999), os produtos amplificados com 1.6 - 2.0 kb referem-se ao gene E1; 1.0 - 1.6 kb, ao gene

E2, e produtos com amplificação até 1.0 kb, ao gene L1 inteiro. No presente estudo, os iniciadores genéricos utilizados são degenerados em algumas posições nucleotídicas, o que pode permitir o anelamento inespecífico de mais de um tipo de nucleotídeo durante a reação de PCR.

No presente trabalho, ocorreram variações dos tamanhos em bp dos fragmentos amplificados dentro de uma mesma espécie e entre diferentes espécies animais, para a pesquisa da presença do PV. Essas variações também foram encontradas no estudo de Forslund et al. (1997), ao detectar 12 novos prováveis tipos de HPVs com variações dos tamanhos de 434 bp, 437 bp, 440 bp e 446 bp dos fragmentos gerados. Os mesmos autores associam o HPV-40 com o fragmento de 740 bp, e o HPV-58 com 264 bp, sendo que a maioria dos HPVs analisados amplifica um fragmento de 478 bp, utilizando o par de iniciadores degenerados FAP59/FAP64, desenhado a partir de amostras clínicas humanas.

Em recente pesquisa do *Ursus maritimus papillomavirus 1* (UmPV-1), foram encontradas múltiplas bandas com tamanhos variáveis de 500 bp, 700 bp, 1.500 bp, 2.300 bp e 2.600 bp (STEVENS et al., 2008). O genoma completo do urso polar com 7.582 bp foi determinado pelo sequenciamento dos cinco fragmentos de DNA clonados. Pela análise filogenética do ORF L1, o UmPV-1 não se agrupou com as outras papilomatoses dos carnívoros, apresentando 60% de identidade com o HPV-32 na sequência dos nucleotídeos, sugerindo a classificação no gênero *Alphapapillomavirus* (STEVENS et al., 2008). Em alguns estudos para caracterização do genoma completo da espécie de PV utilizando *primers* degenerados, o tamanho dos *amplicons* gerados não é mencionado, e informam que as bandas amplificadas são sugestivas de amplificação do DNA viral, como por exemplo, na pesquisa do *Rousettus aegyptiacus papillomavirus 1* (RECTOR et al., 2006).

Outros pesquisadores, como Ogawa et al. (2004), também utilizaram o mesmo protocolo de PCR para amplificação do gene L1, em amostras de papilomas bovinos e em *swabs* de bovinos clinicamente sadios, e detectaram 11 novos tipos de BPVs, apresentando variação de fragmentos de 405 a 416 bp. Conforme a pesquisa de Woodruff et al. (2005), nova infecção pelo PV foi detectada na espécie *Trichechus manatus latirostris*, utilizando o par de *primers* MY09/MY11 e com fragmento com 478 bp, identificado como TmlPV. Antonsson e Mc Millan (2006) detectaram em amostra de Koala, identificada como KoPV, fragmento amplificado de

440 bp, utilizando os mesmos *primers* degenerados FAP59/FAP64, empregados no presente trabalho. Nesse contexto, os iniciadores utilizados FAP59/FAP64 foram construídos para a pesquisa de amostras humanas e foram extensíveis para a pesquisa em outras espécies, identificando supostos novos tipos de PV ainda não descritos.

Assim como neste trabalho, outros estudos sobre o PV apresentaram o alinhamento dos nucleotídeos inferior a 100 bp (MORENO-LOPEZ et al., 1984, p. 874), considerado como tamanho mínimo para a construção da árvore filogenética. Outros autores apresentam alinhamentos com poucas e muitas deleções (TERAI et al., 2002), e a posição dos nucleotídeos alinhados nem sempre é demonstrada. Outros estudos não apresentam os géis com os fragmentos amplificados (CHAN et al., 1997; REHTANZ et al., 2006) e nem os alinhamentos das sequências de nucleotídeos correspondentes (REHTANZ et al., 2006). Entretanto, ainda assim, exibem a árvore filogenética com tamanhos de fragmentos variando entre 57 bp a 100 bp (CLAUS et al., 2007, p. 316). Geralmente, os trabalhos na pesquisa do PV têm utilizado como parâmetro o modelo evolutivo Kimura- 2 e o método pelo agrupamento de vizinhos (*neighbor joining*) com *bootstrap* para 1.000 réplicas (CLAUS et al., 2007, p. 316). Contudo, foi possível analisar filogeneticamente com 77% de *bootstrap* para a ORF L1 e com 24% de *bootstrap* para a construção da árvore filogenética baseada na ORF E1, de acordo com o trabalho de Stevens et al. (2008).

Na análise da filogenia do PV, a maioria dos trabalhos é voltada para a amplificação do gene L1 bem conservado nas papilomatoses de modo geral. Entretanto, essas pesquisas não se restringem aos alinhamentos das sequências dos nucleotídeos apenas no gene de interesse L1 e sim fazem referência aos genes iniciais e ao gene L2 tardio, embora não seja raro não ocorrer alinhamento em uma ou mais ORFs analisadas.

A exemplo do alinhamento das sequências de nucleotídeos do *Tursiops truncatus papillomavirus 2* (TtPV-2), foram encontrados apenas cinco nucleotídeos alinhados com provável ORF E4 do HPV-5 e TmPV-1. Na análise do mesmo gene E4, nenhum alinhamento foi encontrado com o RhPV-1 e HPV-8 (REHTANZ et al., 2006). Na análise da ORF E6 do *Trichechus manatus latirostris papillomavirus 1* (TmPV-1), foi detectado o alinhamento de 22 nucleotídeos com o BPV-1, 31 nucleotídeos com o HPV-5 e nenhuma similaridade com o PcPV (RECTOR et al.,

2004). Foram alinhados 15 e 42 nucleotídeos da sequência do *Rousettus aegyptiacus papillomavirus 1* (RaPV-1) com o ORF E6 e L1 do PsPv, respectivamente (RECTOR et al., 2006).

Na pesquisa do *Ursus maritimus papillomavirus 1* (UmPV-1), foram encontradas diferentes similaridades com outras papilomatoses em diferentes posições de nucleotídeos, de acordo com a análise de ORFs. A análise comparativa de ORF E6 do UmPV-1 com o PsPV-1 apresentou alinhamento com 26 nucleotídeos, ORF E1 alinhou 44 nucleotídeos com o CPV-2; ORF E2 mostrou similaridade com o BPV-1, alinhando 22 nucleotídeos; ORF suposta E4 detectou o alinhamento de 16 nucleotídeos com o HPV-16; ORF L2 demonstrou relação com o TtPV-2, com o alinhamento de 29 nucleotídeos; e ORF L1 apresentou similaridade com o HPV-32, alinhando 60 nucleotídeos (STEVENS et al., 2008).

Seguindo esse parâmetro, as amostras da presente tese também apresentaram alinhamentos com poucos nucleotídeos, variando segundo a espécie analisada. A espécie *Bos taurus* do estudo apresentou alinhamento com 14 nucleotídeos das sequências do HPV-97, EdPV-1 e OvPV-1. Também foi verificada a similaridade com LrPV-1 e HPV-7 no alinhamento de 16 e 19 nucleotídeos. Nos caninos clinicamente saudáveis, verificou-se o alinhamento de 17 nucleotídeos de sequências de isolados diversos do gene L1 do HPV, e com ORF L1 e L2 do HPV-5 (15nt), HPV-8 (15nt), -12 (15nt), -14 (21nt), -36 (15nt), -40 (17nt), -47 (15nt) e -82 (15nt). Também foi detectado o alinhamento com os equídeos EqPV (18nt) e EqPV-1 (18nt) e com as papilomavíroses dos cervídeos EEPV (15nt) e RPV (15nt). As amostras dos caninos portadores de lesões cutâneas adenocarcinomas apresentaram similaridade com o gene L1 do HPV (18nt) e com os HPVs-6 (26nt), -7 (21nt), -8 (18nt), -28 (18nt), ORF E6 do HPV-31 (19nt), -40 (22nt) e -74 subtipo AE10 (15nt). Também apresentaram similaridade com espécies de marsupiais, como o *Bandicoot papillomatosis carcinomatosis virus 2* (33nt) e *Trichosurus vulpecula PV* (19nt), com o golfinho *Tursiops truncatus PV 2* (18nt) e com primata *Pygmy Chimpanzee PV 1* (22nt).

Continuando a pesquisa com as amostras dos avestruzes *Struthio camelus*, identificado como RMA42 e 43, foram alinhados 18 nucleotídeos com o HPV-74 e -107, respectivamente. Este último também apresentou identidade genética com o HPV-34 (30 nt) e BPV-3 (22 nt). Para a espécie *Ara macao* designada como RMA 45, 16 nucleotídeos foram alinhados com UuPV-1. Na pesquisa dos felinos

silvestres, *Panthera onça*, referente à amostra RMA46, alinhou-se com 16 nucleotídeos do HPV-7, e *Felis concolor* (RMA47) apresentou estreita relação com o HPV-84 (18 nt) e HPV-87 (17 nt).

Nesse sentido, tanto as amostras dos autores supracitados, quanto à análise dos nucleotídeos das amostras do presente estudo, evidenciam que o tamanho dos alinhamentos obtidos corresponde a diversas posições nucleotídicas, no pareamento das sequências de espécies distintas, e um maior ou menor número de nucleotídeos alinhados é proporcional à similaridade com a espécie equiparada.

Contudo, os achados da presente tese corroboram com os achados de Mello (2005), de que a presença do PV em animais assintomáticos nem sempre é de fácil detecção. Vale salientar que os iniciadores utilizados na pesquisa de Mello (2005), apesar de não serem os mesmos aplicados neste trabalho, também não são específicos. Segundo Lackovich et al. (2000 apud MELLO et al., 2005, p. 85), na detecção de PV em espécies animais, geralmente, sequências de nucleotídeos não são amplificadas, salientando sua inespecificidade. Até mesmo nas infecções clínicas, com o aparecimento de lesões indicativas de papilomatose, como demonstrado na pesquisa de Sundberg et al., (2000), ao relatar que apenas 40% dos felinos com lesões suspeitas de papilomas e fibropapilomas apresentaram o vírus detectado somente em biópsias das lesões cutâneas.

Estudos de Virologia e Epidemiologia Molecular demonstram a diversidade da família viral nas infecções de HPV e BPV diagnosticadas. Os resultados desta pesquisa corroboram os achados de Claus et al. (2007, p. 317), quando se referem a um número restrito de pesquisas na área do PV, voltado para o estudo da infecção em animais domésticos e silvestres. Fato que reflete a falha de identificação e caracterização dos tipos virais circulantes nas infecções clínicas e subclínicas, mais do que a não-ocorrência de diversidade molecular de PV em espécies diversas.

## 6.2. Análise citogenética

A metodologia usada para análise citogenética, no presente trabalho de tese, foi similar àquela descrita por Trimborn et al. (2004, p. 262), tendo sido observada também a detecção de baixa qualidade de metáfases com baixa resolução no bandamento. Nos recentes trabalhos publicados na área de citogenética de bovinos infectados por BPV, alguns apresentam resultados de bandamento C (LEAL et al., 2003, p.18), evidenciando fusões e fragmentos acêntricos, entretanto, em outros (STOCCO DOS SANTOS et al., 1998, p. 2131; RECOUSO et al., 2003, p. 6), estes rearranjos e aberrações cromossômicas são apresentados apenas com coloração convencional. Muito embora as aberrações cromossômicas possam ser sugeridas pela técnica de coloração convencional, como descrito no presente trabalho, estas devem ser confirmadas pelas técnicas de coloração especial. Mesmo assim, a técnica de bandamento com coloração especial nem sempre consegue detectar os segmentos dos cromossomos específicos envolvidos nas aberrações cromossômicas (LEAL et al., 2003). Segundo Goldshmidt (1982), as técnicas citogenéticas de bandamento para os bovinos apresentam, de modo geral, baixa qualidade na maioria dos trabalhos publicados e não permitem que os padrões estabelecidos sejam considerados como definitivos.

Os bovinos analisados citogeneticamente, neste estudo, não estavam expostos à ingestão de samambaia do campo (*Pteridium aquilinum*), considerado, por Leal et al. (2003, p. 16), como um agente carcinogênico que interfere nos níveis iniciais e tardios do processo da infecção pelo PV. Mesmo sob condições de dieta alimentar livre de samambaia do campo, os bovinos desta pesquisa apresentaram indícios de fragilidade cromossomal. As amostras de papilomas sequenciadas dos bovinos apresentaram similaridade com as sequências de nucleotídeos do gene E1 parcial do HPV, HPV-97 e similaridade com outros PVs. PVs das espécies *Lynx rufus papillomavirus 1*, *Erethizon dorsatum papillomavirus* e *ovine papillomavirus* revelaram, pela análise cromossomal, aberrações numéricas e estruturais presentes nas culturas de linfócitos do sangue periférico e nas culturas das lesões dos papilomas.

Os resultados das análises cromossômicas encontrados neste trabalho são compatíveis com os de Mansur e Androphy (1993, p. 332), Thompson et al. (1997) e Recouso et al. (2003), ao citarem que o aumento e a diminuição do número de

cromossomos normais, como também a presença de possíveis anomalias estruturais, são achados comuns observados nas populações de células neoplásicas, inclusive em humanos infectados pelo HPV e positivos para o câncer cervical. Atualmente, os trabalhos na área de citogenética do PV têm focado a análise de aberrações cromossômicas estruturais. No estudo de Recouso et al. (2003, p. 5), em que apenas 7% do total de células analisadas apresentaram algum tipo de anomalia estrutural, considerando a presença de apenas uma aberração cromossômica até nove anomalias estruturais nas células analisadas. No presente trabalho, foi observado que as anomalias numéricas ocorreram em maior número quando comparadas com as aberrações estruturais, conforme os dados de Duelli e Lazebnik (2007, p. 969), ao citarem que a variação do número de cromossomos (34 - 184) é um indicativo de instabilidade cromossomal. De acordo com Hashida e Yasumoto (1991 apud STOCCO DOS SANTOS, p. 2128), anormalidades numéricas como triploidias (3n) e tetraploidias (4n) têm sido descritas em células epiteliais imortalizadas de HPV-16 em humanos. Contudo, no presente trabalho, observaram-se variações quanto ao número diploide, menor ou maior do que o número normal de cromossomos (hipoploidias e hiperploidias), nas culturas de linfócitos do sangue periférico de bovinos, caninos e equinos, portadores de lesões clínicas verrucosas. Alta incidência de células hipoploides e hiperploides também foi descrita nos estudos de Leal et al. (2003, p.19). Segundo Reid et al. (1984 apud MANSUR e ANDROPHY, 1993, p. 332), o percentual de células aneuploides variou de 33% a 82% nos casos de lesões neoplásicas intraepiteliais cervicais em mulheres infectadas pelo HPV. No presente trabalho, encontrou-se nos bovinos um percentual médio de 67,29% nas células com hipoploidia e 4,01% nas células com hiperploidia. Segundo Leal et al. (2003), o percentual médio também foi superior para células com hipoploidia, em células experimentalmente infectadas pelo oncogene E7 do BPV-4. O número de células hipoploides dos equinos e caninos também foi superior ao de células hiperploides, no presente trabalho.

Na análise dos cariótipos de bovinos, equinos e caninos, no presente trabalho, foi verificado que nem todos os cariótipos apresentavam-se completos ou o número de cromossomos excedia ao normal da célula diploide 2n. Segundo Nicholas (1997), esses cariótipos anormais se originam de erros em sua replicação cromossômica. Aberrações cromossômicas, tais como associações, fusões, fragmentos e “gaps”, descritas nos linfócitos de bovinos, segundo relatos prévios,



são compatíveis com os nossos resultados. Aberrações estruturais, como marcadores cromossômicos, também têm sido encontradas em populações de bovinos e em populações humanas (RECOUSO et al., 2003). Estes marcadores são cromossomos anormais e morfologicamente diferentes dos cromossomos conhecidos no genoma estudado. Possuem centrômero e são geralmente derivados de uma quebra do cromossomo com perda do fragmento acêntrico (RICHARDSON, 1991). No presente estudo, foram encontradas alterações sugestivas de fragmentos cromossômicos nas metáfases obtidas da cultura dos linfócitos de bovinos com papilomatose cutânea. Também têm sido encontrados quebras e intervalos ou “gaps”, que ocorrem em vários estágios da divisão celular. O termo quebra ou intervalo de cromátide ocorre apenas em uma cromátide, já a quebra ou intervalo cromossômico refere-se à anomalia estrutural que ocorre em ambas as cromátides, no mesmo ponto do cromossomo (RICHARDSON, 1991). Lesões cromossômicas sugestivas de intervalos ou “gaps”, no presente estudo, foram encontradas nas metáfases dos linfócitos do sangue periférico de bovinos infectados pelo PV.

No presente trabalho, caninos portadores de lesões adenocarcinomas que apresentaram, pela análise molecular, similaridade genética com a sequência de nucleotídeos de PV de outros hospedeiros, revelaram, pelo estudo cromossomal, aberrações numéricas e estruturais. Tais aberrações foram obtidas a partir da cultura de linfócitos do sangue periférico e da cultura de biópsias cutâneas, similares à análise cromossômica nos bovinos. Ao analisar os resultados obtidos nas culturas das lesões cutâneas dos bovinos, foram observadas, ao microscópio óptico, imagens sugestivas de diferentes estágios de condensação da cromatina, correspondente à nomenclatura específica de condensação de cromossomos prematuros (PCC) (RAO, 1981). Rao et al. (1981) descreverem as morfologias cromossômicas correspondentes a cada fase da intérfase na divisão do ciclo celular. Tais configurações são compatíveis com estudos da leucemia humana (HITTELMAN et al., 1981, p. 379). No presente estudo, a PCC encontrada na fase S, com configuração de pulverização cromossômica, aponta para falhas no ciclo celular, passíveis de instabilidade genômica, e estão de acordo com Thompson et al. (1997, p. 3031) quanto aos mecanismos de descontrole celular.

A PCC resultante da fusão entre células interfásicas e células mitóticas presentes neste trabalho foi descrita pela primeira vez na década de 70 por Rao e Johnson. Até o momento, a PCC não havia sido registrada na infecção pelo PV, mas

sim nas infecções pelo SV (RAO et al., 1981) e, mais recentemente, pelo EBV (ITO et al., 2002; LEE et al., 2007). Dessa forma, pela primeira vez, evidencia-se a presença de PCC nas células infectadas pelo PV em bovinos, equinos e caninos. Nos tecidos das lesões cutâneas em bovinos e caninos, detectou-se a presença da sequência de nucleotídeos do DNA viral, através da reação de PCR. Embora o fenômeno da PCC possa ser induzido por processos químicos (THOMPSON et al., 1997, p. 3034; GARCIA et al., 2001, p.121; TRIMBORN et al., 2004, p. 2041; GOTOH e DURANTE, 2006, p. 299; LEE et al., 2004, p.195), outros trabalhos demonstram a ocorrência de PCC resultante da infecção pelo SV (RAO et al., 1981) e EBV (ITO et al., 2002; LEE et al., 2007). Assim, como se encontrou PCC nas culturas de linfócitos de bovinos, equinos e caninos, infectados pelo PV, sem qualquer intervenção ou processo terapêutico químico, fato que pode ser atribuído a provável presença do vírus. A PCC encontrada no presente trabalho, provavelmente, decorreu da ação do PV induzindo a proliferação celular exacerbada e promovendo a fusão das células pré-mitóticas, assim como descrito por Rao et al. (1981), Ito et al. (2002) e Lee et al (2007).

No presente trabalho, também foram observadas numerosas sobreposições cromossômicas e grande variação do número de cromossomos nas metáfases, em maior número do que as anomalias estruturais, quando analisadas nas culturas dos linfócitos e nas lesões neoplásicas dos grupos de animais estudados. Devido ao grande número de cromossomos de bovinos e caninos, possivelmente, alguns sejam perdidos durante a preparação cromossômica. Entretanto, esse achado também pode estar relacionado à presença do PV, como já descrito em bovinos por outros autores (STOCCO DOS SANTOS et al., 1998; LEAL et al., 2003). Normalmente, essas anomalias cromossômicas não são observadas em altos níveis nas culturas de linfócitos de bovinos. Todavia, baseado nos resultados citogenéticos, anomalias cromossômicas foram observadas nos linfócitos de bovinos, caninos e equinos, descritas como associações, fragmentos cromossômicos e aberrações numéricas (hipoploidia e hiperploidia) com predominância das células hipoploides para os bovinos. Este achado para os bovinos foi semelhante aos descritos por Leal et al. (2003, p.18) em linhagens celulares do palato de feto bovino macho transfectado com gene E7 do BPV4, ativação de oncogene específico e após tratamento com quercetina, cofator que age em sinergismo com a ação viral.

Neste trabalho de tese, observou-se a variação no número de células com PCC, encontrada principalmente nas culturas das lesões, causando uma possível instabilidade cromossomal em consequência da fusão entre células na intérfase com células mitóticas ou pré-mitóticas. Os achados de PCC, em sua maioria, apresentaram-se na fase S e, de acordo com os estudos de Duelli e Lazebnik (2007, p. 968), referem-se a múltiplas quebras de DNA que resultam em múltiplos fragmentos cromossômicos, comprovados pela aparência pulverizada da célula. Segundo relatos de Lee et al., (2007, p. 5166), a cromatina de células de carcinoma nasofaríngeo torna-se altamente condensada quando positivas para o EBV. Do mesmo modo, as cromatinas das células de adenocarcinomas nos caninos e das células de papilomas dos bovinos apresentaram altos índices de PCC. Achados semelhantes também aos observados por Ito et al. (2002, p. 2379), após análise, pela microscopia confocal da cromatina condensada, na intérfase em células infectadas pelo EBV.

No presente trabalho, o alto índice de PCC observado foi similar ao do estudo de Lee et al. (2004, p.195), ao tratar os linfócitos com caliculina A, experimentalmente, induzindo a formação de PCC. Também esteve de acordo com o mesmo estudo (LEE et al., 2004, p.196), ao verificar que o número de células de PCC variou de 160 a 1.040 para cada amostra de pacientes com câncer pulmonar tratado quimicamente com caliculina A. As culturas das lesões de papilomas e os linfócitos dos bovinos, equinos e caninos apresentaram fenótipo celular similar à prófase, em concordância com o estudo de Trimborn et al. (2004, p. 262), ao referir-se às aberrações de PCC encontradas como mutações genéticas.

Em experimentos de linfócitos tratados com metil metanosulfanato (MMS) para indução química de PCC, verificou-se quebra cromossômica, com aparência de cromossomos fortemente fragmentados, detectada apenas em altas doses químicas e relacionando-se à quebra cromossômica com a dose-dependente (GARCIA et al., 2001, p.122). No presente trabalho, muitas células também se apresentaram altamente fragmentadas, indicando quebra celular nos linfócitos dos animais investigados. Tais células fragmentadas, provavelmente, surgiram devido à quantidade de alta carga viral infectante, capaz de induzir a lise celular. Também foram observados fragmentos cromossômicos que correspondem à descrição de aparência pulverizada dos cromossomos na intérfase, nas culturas dos linfócitos do sangue periférico dos bovinos, equinos e caninos, do presente estudo. O mesmo se

observou no estudo em que as células foram tratadas quimicamente com MMS e com camptotecina (CPT) (GARCIA et al., 2001, p.124). Tais configurações pulverizadas também foram detectadas nas culturas das lesões dos animais estudados, assim caracterizando a presença de PCC.

O procedimento adotado, na análise estatística dos achados citogenéticos em bovinos, equinos e caninos, utilizou testes não-paramétricos. Teste como o de Friedman, o qual compara mais de dois grupos, e o de Wilcoxon, para avaliação entre dois grupos ou duas variáveis. Também aplicados aos estudos de Gamonal (2001), ao avaliar o fenótipo do infiltrado celular em lesões induzidas pelo HPV, e à pesquisa descrita por Phillipin et al. (2006, p.135). Entretanto, estes testes aplicados não evidenciaram nenhuma correlação entre a quantidade de PCC observada na cultura de linfócitos e na cultura das lesões dos bovinos, demonstrando que são fatores provavelmente independentes. Pela análise estatística, apenas foi evidenciado que a ocorrência de células com hipoploidia foi maior em todas as espécies analisadas, assim como encontrado por Leal et al. (2003) no caso de células bovinas, experimentalmente, infectadas pelo oncogene E7 do BPV-4.

### **6.3. Análise histopatológica**

A similaridade morfológica, macro e microscópica evidenciou achados característicos da papilomatose cutânea e da mucosa oral nas lesões analisadas. Apesar dos sinais similares, tais como, forma, coloração e localização das lesões, as amostras de algumas delas foram diagnosticadas como outras dermatopatias semelhantes aos casos de dermatites inflamatórias encontradas por Yuan et al. (2007, p. 245). Embora estudos relatem que condições inflamatórias epiteliais, como a psoríase em humanos, podem estar associadas ao HPV-5, estas lesões inflamatórias, também diagnosticadas neste estudo, podem ser possíveis “reservatórios” da infecção viral, segundo estudos de Favre et al. (1998 apud YUAN et al., 2007, p. 248).

Histologicamente, nos espécimes teciduais dos bovinos, os estágios de diferenciação do tecido epitelial revelaram queratinização, acantose, grânulos querato-hialinos na camada granulosa e corpúsculos de inclusões intranucleares basofílicos, ocasionalmente detectados na camada superior da epiderme. Tais

achados correspondem às propriedades biológicas características de infecção produtiva das células infectadas pelo PV, conforme descrições de Howly e Lowy (2001).

Os achados da lesão papilífera foram idênticos aos encontrados na espécie *Erethizon dorsatum* PV (EdPV-1), com regiões epidermais hiperplásicas (acantose e hiperqueratose ortoqueratótica), com coilócitos no estrato granuloso e na camada inferior do estrato córneo (RECTOR et al., 2005). De forma semelhante, foram os achados histológicos da infecção pelo PV em amostras de leões asiáticos (*Panthera Leo persica*) (SUNDBERG et al., 1996, p.63). Alterações microscópicas idênticas também foram encontradas no trabalho de Maeda et al. (2007, p. 245), ao analisar histologicamente a proliferação epidermal com hiperplasia e acantose no estrato córneo e espinhoso de verrugas cutâneas, provenientes das tetas de vacas afetadas pela papilomatose. Do mesmo modo que a análise histopatológica das lesões orais do urso polar (*Ursus maritimus*) revelou hiperplasia epitelial com formação de papilas dérmicas e hiperqueratose ortoqueratótica (STEVENS et al., 2008), alterações histológicas também encontradas nas amostras da presente pesquisa.

Macroscopicamente, projeções circulares e sésseis, com superfícies achatadas e algumas vezes planas, com coloração rósea, já descritas por Maeda et al. (2007, p. 244), também foram observadas no presente trabalho, ao analisar fragmentos de biópsias da mucosa oral do leão asiático (*Panthera leo persica*), e primata *Cynomolgus* (*Macaca fascicularis*).

De acordo com os achados clínico-morfológicos do presente estudo, os aspectos histopatológicos relativos à avaliação macro e microscópica das lesões estão bem representados pela casuística dos dados encontrados, similarmente aos estudos de Gamonal (2001), ao avaliar o padrão histopatológico e clínico das lesões de HPV.

As lesões cutâneas da infecção pelo PV encontradas no presente trabalho, geralmente, apresentaram-se esbranquiçadas e/ou rosadas, quando localizadas em regiões vascularizadas como as mucosas, indicando hipopigmentação. Outras lesões apresentaram-se acinzentadas e/ou enegrecidas, geralmente identificadas no tecido cutâneo, indicando hiperpigmentação. Achado que sugere, segundo Net et al. (1997, p.13), um distúrbio na síntese de melanina e/ou interações entre melanócitos e queratinócitos no infiltrado celular. Tais tonalidades estão diretamente proporcionais ao sítio anatômico específico, sujeito à vascularização local ou não.

Lesões sugestivas de infecção pelo PV, em maior número, não foram encontradas nas diversas espécies animais investigadas neste estudo. Fato que aponta a grande dificuldade na obtenção de amostras de biópsias de pele ou mucosa, em razão do não-surgimento de lesões clínicas ou frente ao difícil acesso a este material. Observou-se que as manifestações clínicas nos animais, associadas ao vírus, são muito semelhantes, macro e microscopicamente às descritas em mais de 200 tipos de PV detectados em humanos, de acordo com sua predileção por um sítio anatômico específico.

Segundo estudos de Antonsson e McMillan (2006, p. 3197), uma lesão extraída de Koala, macho com dois anos de idade, confirmada histologicamente como hiperplasia da glândula sebácea, revelou, pela análise molecular, amplificação para DNA do PV, identificado como KoAA1. Similar ao estudo dos cães, na presente pesquisa, diagnosticados microscopicamente como adenoma e carcinoma, que apresentaram em suas amostras amplificação do DNA viral.

Sequências de DNA do PV também têm sido detectadas em amostras de carcinoma das células escamosas de golfinhos da espécie “nariz de garrafa” (*Tursiops truncatus*) e em amostras de carcinoma basoescamoso na asa de morcego frutífero espécie “egípcia” (*Rousettus aegyptiacus*) (RECTOR et al., 2006, p. 267). Assim, parece que a presença do PV não é exclusiva de lesão papilomatosa ou de verrugas cutâneas. Como também a detecção do efeito citopático viral pela histopatologia, confirmado pela imunohistoquímica e, ultraestruturalmente, pela microscopia eletrônica, revelou a infecção pelo PV no diagnóstico de hiperplasia oral focal em leões asiáticos (*Pantehra leo persica*) (SUNDBERG et al., 1996, p.63).

Notou-se que o processo de diferenciação do epitélio escamoso cutâneo normal em conjunto com a atividade do PV, na produção de lesões neoplásicas infectadas, ocorre diferentemente do processo de diferenciação epitelial mucoso. Segundo Howley e Lowy (2001), as células diferenciadas da mucosa oral, cervical e laringeal expressam queratinas 4 e 13, em vez das queratinas 1 e 10, no epitélio cutâneo, caracterizando a expressão gênica em estágios de diferenciação específica, de acordo com o tipo de tecido epitelial infectado.

Os genes E6 e E7, envolvidos como fatores cruciais no desenvolvimento do câncer, interferem na diferenciação epitelial normal e induzem falha no controle celular da transcrição viral (MANSUR e ANDROPHY, 1993, p. 341). Estes genes

proteicos são expressos consistentemente nas células infectadas pelo PV, segundo Thompson et al. (1997, p. 3031).

No trabalho de Lioi et al. (2004, p. 234), bovinos, com hematúria enzoótica crônica, foram diagnosticados, pela análise histopatológica, como portadores de lesões carcinomatosas, papilomatosas e adenomatosas. Resultados similares foram diagnosticados microscopicamente no presente trabalho, pelas alterações encontradas em biópsias cutâneas dos caninos, as quais se mostraram sugestivas de positividade pela técnica de PCR para a infecção viral. Tem sido descrito que papilomas na mucosa oral de caninos evoluem para neoplasias malignas pela ação viral. No entanto, neste estudo, verificaram-se amostras de lesões cutâneas como estágio inicial de tumoração das células escamosas.

A presença do PV, nas lesões provenientes de biópsias cutâneas, pode predispor o animal a ativar o mecanismo da carcinogênese, pelos estágios de iniciação, promoção e progressão, com indução ou não de agentes cofatores carcinogênicos, como a ingestão crônica da samambaia do campo (*Pteridium aquilinum*). Entretanto, os animais deste estudo não mantinham contato com qualquer tipo de cofator que potencializasse a infecção e a carcinogênese viral.

## 7. CONCLUSÃO

Na análise molecular, a partir de amostras sanguíneas e teciduais dos animais em estudo, com a aplicação da técnica de PCR, utilizando o par de *primers* degenerados FAP59/FAP64, para detecção do DNA de PV nas diversas espécies, sequências do DNA viral foram detectadas em espécimes biológicos de caninos (*Canis familiaris*), bovinos (*Bos taurus*), ovinos (*Ovis aries*), felinos silvestres (*Panthera onca* e *Felis concolor*) e aves (*Ara macao*, *Ara chloroptera* e *Struthio camelus*). Entretanto, o estudo molecular realizado não permitiu a detecção de bandas amplificadas em algumas amostras, como nas amostras dos suínos (*Sus domesticus* e *Sus scrofa*) e dos equinos (*Equus caballus*). Concluiu-se que tal fato tenha ocorrido devido à presença do PV em limites abaixo de detecção ou devido ao PV presente não estar detectável pela utilização de *primers* voltados para a análise na região amplificadora L1. Consequentemente houve deleções do gene L1 de tais amostras e possível perda de material cromossômico.

Na análise citogenética, as espécies domésticas *Bos taurus*, *Equus caballus* e *Canis familiaris*, portadoras de lesões papilomatosas cutâneas, apresentaram fragilidades cromossômicas nas metáfases obtidas a partir das culturas de linfócitos do sangue periférico. Consequentemente houve alterações cromossômicas semelhantes a associações, fragmentos, fusões cêntricas, cromátides abertas, “gaps”, rearranjos, anéis e aneuploidias. Portanto, o estudo citogenético realizado permitiu a detecção de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas, assim como de células com condensação de cromossomos prematuros (PCC), encontradas nas culturas de linfócitos e nas culturas das lesões obtidas de biópsias cutâneas. Concluiu-se que tais anomalias foram induzidas pela ação do PV.

Sobre o estudo citogenético da presente pesquisa, conclui-se ainda que houvesse pioneirismo: na detecção do PV na espécie doméstica *Struthio camelus* e nas espécies silvestres *Panthera leo*, *Panthera onca*, *Felis concolor*, *Ara macao*, *Ara chloroptera*, *Ara ararauna*, *Sus scrofa* e *Macaca fascicularis*; na detecção de células com PCC nas espécies domésticas *Bos taurus*, *Equus caballus* e *Canis familiaris*; e na descrição das aberrações cromossômicas (estruturais e numéricas) nas espécies domésticas *Canis familiaris* e *Equus caballus* com lesões de papilomas.



Na análise histopatológica, concluiu-se que, na infecção viral clínica, as lesões (tanto micro, quanto macroscopicamente) apresentaram as mesmas alterações histológicas na diferenciação epitelial independente do hospedeiro do PV. Concluiu-se ainda que, em outras patologias epidermais com lesões não diagnosticadas como papilomas, não se deve excluir a hipótese de infecção viral, uma vez que o PV não é específico de lesões verrucosas.

## 8. RECOMENDAÇÕES

Dada a detecção de níveis de bandas distintas representadas pelos diferentes tamanhos de fragmentos visualizados no gel, sugere-se a realização de alterações técnicas experimentais desde protocolos mais refinados, referentes às condições de PCR para cada espécie estudada até a padronização das reações. Como, por exemplo, a alteração da temperatura de anelamento (*annealing temperature*) realizando um *touchdown*, ou desenhar pares de iniciadores específicos para os genes virais e serem testados nas diversas amostras pela técnica de PCR *multiplex*. Após a padronização do protocolo de PCR, sugere-se a utilização de *kits* de clonagem e posterior sequenciamento das amostras. As sequências obtidas deverão ser novamente pesquisadas pelo BLAST para a identificação da similaridade do PV e posterior construção da árvore filogenética, baseada na análise evolutiva do fragmento proteico L1, nas múltiplas sequências catalogadas e no seu grau de homologia interespecies.

Diversos fatores podem interferir nas preparações citogenéticas para a obtenção de metáfases com boa qualidade, tais como: o transporte do material ao laboratório, conservação do material sob refrigeração, dificuldade da técnica de bandamento na confirmação de algumas alterações, entre outros. Dessa forma, para a obtenção de melhores resultados, recomenda-se a aplicação de técnicas de alta resolução nas culturas de citogenética, utilizando a associação de substâncias químicas tais como Methotrexate (MTX) e timidina, ou Florodeoxyuridina (FUdR) e timidina, ou *Synchroset*, ou ainda *Chromosome Resolution Additive* (CRA) Genial. Além de diferentes protocolos das técnicas de alta resolução, recomenda-se o estudo da citogenética molecular, por meio da técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) com a utilização de sondas específicas para marcação cromossômica (LEE et al., 2004; GOTOH e DURANTE, 2006). Com relação às técnicas de bandamento, recomenda-se que os protocolos citogenéticos devam ser reajustados, devido às peculiaridades dos diversos espécimes em questão.

Com o intuito de complementar os achados histológicos característicos da infecção pelo PV, a marcação dos corpúsculos de inclusão basofílicos intranucleares, bem como a pesquisa da p53, e as partículas virais infectantes,

podem ser visualizados e comparados, por meio dos testes imunohistoquímicos e de microscopia eletrônica de transmissão, respectivamente.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOUSLAM, O.E., LEVKUT, M., LEVKUTOVÁ, M., REVAJOVÁ, V., ONDREJKA, R., BENÍSEK, Z. Immunohistochemistry of the progressive and regressive stages of bovine papillomatosis. **Acta Veterinaria Brunensis**, v. 66. n. 4, p. 245-248, 1997.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. "Basic local alignment search tool". **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.

ANTONSSON A., McMILLAN, N.A.J. Papillomavirus in healthy skin of Australian animals. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3195-3200, 2006.

APPEL, M.J. Virus infections of carnivores. In: Horzinek, M. (ed.) **Canine papillomavirus**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, v. 1, p. 55-59, 1987.

BARBOSA, C.L. Estudo citogenético em equinos (*Equus caballus*) com problemas reprodutivos. Monografia, Faculdade de Veterinária, **Universidade Federal Fluminense**, p. 49, 1997.

BARCH, M.J., LAWCE, H.J., ARSCHAM, M.S. Peripheral Blood Culture. In: The **ACT Cytogenetics Laboratory Manual**, 2.ed, Margaret J. Barch (Eds.), Raven Press: New York, p. 17-30, 1991.

BLOOD, D.C., RADOSTITS, O.M. Clínica Veterinária. In: **Doenças virais caracterizadas por lesões cutâneas**, 7.ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 790 - 805, 1991.

BLOCH, N., SUTTON, R.H., BREEN, M., SPRADBROW, P.B. Identification of papillomaviruses in scrapings from bovine warts by use of the polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, v. 21, n. 1, p. 63-68, 1997.

CAMPO, M.S. Review bovine papillomavirus and cancer. **The Veterinary Journal**, v. 154, n. 3, p. 175-188, 1997.

CAMPO, M.S., JARRET, W.F.H., O` NEIL, W., BARRON, R.J. Latent papillomavirus infection in cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 56, n. 2, p. 151-157, 1994.

CAMPO, M.S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. **Virus Research**, v. 89 n. 2, p. 249-261, 2002.

CARVALHO, C., FREITAS, A.C., BRUNNER, O., YAGUIU, A., BEÇAK, W., STOCCO DOS SANTOS, R.C. Detection of bovine papillomavirus DNA sequences in bovine gametes and reproductive tract. In: XIV Encontro Nacional de Virologia. Florianópolis. **Journal of the Brazilian Society for Virology**, v. 8, n. 1, p. 166, 2003a.

CARVALHO, C., FREITAS, A.C., BRUNNER, O., GÓES, L.G.B., YAGUIU-CAVALCANTE, A., BEÇAK, W., STOCCO DOS SANTOS, R.C. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. In: XIV Encontro Nacional de Virologia. Florianópolis. **Virus Reviews & Research**, v. 8, n. 1, p. 82-84, 2003b.

CHAMBERS, G., ELLSMORE, V.A., O'BRIEN, P.M., REID, S.W.J., LOVE, S., CAMPO, M.S., NASIR, L. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 1055-1062, 2003.

CHAN, S.Y., BERNARD, H.U., RATTERREE, M., BIRKEBAK, T.A., FARAS, A.J., OSTROW, R. Genomic diversity and evolution of papillomaviruses in Rhesus Monkeys. **Journal of Virology**, v. 71, n. 7, p. 4938-4943, 1997.

CHAN S.Y., DELIUS H, HALPERN A.L. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: Uniting typing, phylogeny, and taxonomy. **Journal of Virology**, v. 69, n. 7, p. 3074-3083, 1995.

CHEN, Y., GHIM, S., JENSON, A.B., SCHLEGEL, R. Mutant canine oral papillomavirus L1 capsid proteins which form virus-like particles but lack native conformational epitopes. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2137-2146, 1998.

CORRÊA, W.M., CORRÊA, C.C.M. **Enfermidades Infeciosas dos mamíferos domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 843 p, 1992.

COURSEN, J.D., BENNET, W.P., GOLLAHON, L., SHAY, J.W., HARRIS, C.C. Genomic instability and telomerase activity in human bronchial epithelial cells during immortalization by human papillomavirus -16 E6 and E7 genes. **Experiential Cell Research**, v. 235, n. 1, p. 245-313, 1997.

CRESPO, R B. Manual Prático de Histotécnicas (Monografia). Centro de Biociências e Biotecnologias, **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF**, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, p. 82, 2006.

DESROCHERS, A., ST-JEAN, G., KENNEDY, G.A. Congenital cutaneous papillomatosis in a one-year-old Holstein. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 646-647, 1994.

DILLNER, L., HEINO, P., MORENO-LOPEZ, J., DILLNER, J. Antigenic and immunogenic epitopes shared by human papillomavirus type 16 and bovine, canine, and avian papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 65, n. 12, p. 6862-6871, 1991.

DOORSLAER, K.V., RECTOR, A., VOS P., RANST M.V. Genetic characterization of the *Capra hircus papillomavirus*: A novel close-to-root artiodactyls papillomavirus. **Virus Research**, v. 118, p. 164-169, 2006.

DUELLI, D., LAZEBNIK, Y. Cell-to-cell fusion as a link between viruses and cancer. **Nature Reviews - Cancer**, v. 7, p. 968-976, 2007.

EISA, M.I., KANDEEL, A., EL-SAWALHY, A.A., ABOUEL-FETOUH, M.S. Some studies on bovine papillomavirus infection in cattle with trials of its treatment. **Veterinary Medicine Journal Giza**, v. 48, n. 1, p. 47-55, 2000.

ERIKSSON, A., AHOLA, H., PETTERSSON, U., MORENO-LOPÉZ, J. Genome of the *European elk papillomavirus* (EEPV). **Virus Genes**, v. 1, n. 2, p. 123-133, 1988.

ERIKSSON, A., STEWART, A. C., MORENO-LOPÉZ, J., PETTERSSON, U. The genomes of the animal papillomaviruses *European elk papillomavirus*, *deer papillomavirus*, and *reindeer papillomavirus* contain a novel transforming gene (E9) near the early polyadenylation site. **Journal of Virology**, v. 68, n. 12, p. 8365-8373, 1994.

EVANS, A.G. Moléstias da pele - Dermatopatias. In: Smith, B.P. (ed.) **Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais**. São Paulo: Manole, v. 2, p. 1249-1286, 1994.

FERNANDES, A.T.G. Identificação de células citotóxicas presentes no processo inflamatório uterino durante a co-infecção pelo vírus da Imunodeficiência humana (HIV) e pelo vírus do papiloma humano (HPV). Dissertação de Mestrado. Biologia Parasitária, **Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ**, Rio de Janeiro, 82 p, 2003.

FILLIPIN, C., CHISTOFOLETTI, L.D., RIBEIRO, M.C.M., VITURI, C.L. Determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (Ag NOR) em lesões do epitélio cervical uterino. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 3, p. 133-139, 2006.

FOZ FILHO, R.P.P., LUCAS, R., MAIORKA, P.C., YOSHINO, M.L. Retirada cirúrgica de fibropapiloma eqüino por meio de criocirurgia. In: V Congresso Brasileiro de Medicina e Anestesiologia Veterinária. Rio de Janeiro, **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 9, n. 1, p. 282 - 283, 2002.

FREITAS, A.C., CARVALHO, C., BRUNNER, O., BIRGEL, E.H. Jr., DELLALIBERA, A.M.M.P., BENESI, F.J., GREGORY, L., BEÇAK, W., STOCCO DOS SANTOS, R.C. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 76-78, 2003.

GAMONAL, S.B.L. Presença do vírus do papiloma humano (HPV) e sua relação com o fenótipo do infiltrado inflamatório em lesões pré-malignas e malignas da mucosa oral. Dissertação de Mestrado em Imunologia - Instituto Oswaldo Cruz (Fundação Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 117 p, 2001.

GARCIA, C.L., CARLONI, M., PALMA DE LA PEÑA, N., FONTIN, E., PALITTI, F. Detection of DNA primary damage by premature chromosome condensation in human peripheral blood lymphocytes treated with methyl methanesulfonate. **Mutagenesis**, v. 16, n. 2, p. 121-131, 2001.

GARCÍA-VALLVÉ, S., IGLESIAS-ROZAS, J.R., ALONSO, A., BRAVO, I.G. Different papillomaviruses have different repertoires of transcription factor binding sites: convergence and divergence in the upstream regulatory region. **BMC – Evolutionary Biology**, v. 6, n. 20, p. 1-14, 2006.

GHIM, S.J., NEWSOME, J., BELL, J., SUNDBERG, J.P., SCHLEGEL, R., JENSON, A.B. Spontaneous regressing oral papillomas induce systemic antibodies that neutralize canine oral papillomavirus. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 68, p. 147- 151, 2000.

GIANNONI, M., LUI, J.L. **Citogenética e sua aplicação na seleção de reprodutores eqüinos**, Jaboticabal, FUNEP, 31 p, 1988.

GOLDSCHMIDT, B. Estudo cromossômico em bovinos da raça Gir. Dissertação de Mestrado, Genética, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, p. 83, 1982.

GORDON, P.J. Surgical removal of a fibropapilloma from the reticulum causing apparent vagal indigestion. **Veterinary Record**, v. 140, p. 69-70, 1997.

GOTOH, E., DURANTE, M. Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools. **Journal of cellular physiology**, v. 209, p. 297 - 304, 2006.

GRÜNDER, N.D. Pêlos, pele, tecido subcutâneo, mucosas aparentes e cornos. Dirken, G., Gründer, H.D., Stöber, M (eds.) In: Rosenberger – **Exame Clínico dos Bovinos**, 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 81-92, 1993.

GUSTASHAW, K, M. Chromosome Stains. In: **The ACT Cytogenetics Laboratory Manual**, 2.ed, Margaret J. Barch (Eds.), Raven Press: New York, p. 205-296, 1991

HAMADA, M., OYAMADA, T., YOSHIKAWA, H., YOSHIKAWA, T. Morphological studies of esophageal papilloma naturally occurring in cattle Japanese. **Journal Veterinary Science**, v. 51, n. 2, p. 345-351, 1988.

HANNA, P.E., DUNN, D. Cutaneous fibropapilloma in a cat (feline sarcoid). **Canadian Veterinary Journal**, v. 44, p. 601-602, 2003.

HARGIS, A.M. Neoplasias cutâneas. Carlton, W.W., Mc Gavin, M.D. (eds.) In: **Patologia Veterinária Especial de Thomson**, 2.ed., Porto Alegre: Artmed, p. 533-540, 1998.

HAYWARD, M.L.R., BAIRD, P.J., MEISCHKE, H.R.C. Filiform viral squamous papillomas on sheep. **Veterinary Record**, v.132, n. 4, p. 86 - 88, 1993.

HITTELMAN, W.N., RAO, P.N., Mc CREDIE, K. B. Premature Chromosome condensation studies in human leukemia. In: **Genes, Chromosomes and Neoplasia**. Francis Arrighi, Potu Rao e Elton Stubblefield (Eds.). Raven Press: New York. p. 379-403, 1981.

HEMMATZADEH, F., FATEMI, A., AMINI, F. Therapeutic effects of fig tree latex on bovine papillomatosis. **Journal Veterinary Medicine**, v. 50, p. 473-476, 2003.

HOWLEY, P.M., LOWY, D.R. Papillomaviruses and Their Replication. In: KNIFE, D.M., HOWLEY, P.M. (eds.) **Fields Virology**. 4.ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, p. 2197-2229, 2001.

HOWELL, W.M., BLACK, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one step method. **Experimental**, v. 36, p. 1014, 1980.



HU, J., CLADEL, N.M., BUDGEON, L.R., REED, C.A., PICKEL, M.D., CHRISTENSEN, N.D. Protective cell-mediated immunity by DNA vaccination against papillomavirus L1 capsid protein in the cottontail rabbit papillomavirus model. **Viral Immunology**, v. 19, p. 492-507, 2006.

HU, J., CLADEL, N.M., CHRISTENSEN, N.D. Increased immunity to cottontail rabbit papillomavirus infection in EIII/JC inbred rabbits vaccination with a mutant E6 that correlates with spontaneous regression. **Viral Immunology**, v. 20, p. 320-331, 2007.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV **ICTV approved Virus Orders, Families and Genera**; <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>. Acesso em: 27 out..2008.

ITO, S., GOTOH, E., OZAWA, S., YANAGI, K. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 is highly colocalized with interphase chromatin and its newly replicated regions in particular. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 2377-2383, 2002.

JACOBSON, E.R., SUNDBERG, J.P., GASKIN, J.M., KOLLIAS, G.V., O'BANION, M.K. Cutaneous papillomas associated with a herpesvirus-like infection in a herd of captive African elephants. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 1, p. 1075-1078, 1986.

JAWETZ, E., MELNICK, J.L., ADELBERG, E. A. **Microbiologia médica**. 15. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 568 p, 1984.

JONES, T.C., HUNT, R.D., KING, N.W. **Patologia Veterinária**, 6.ed, São Paulo: Manole, 1415 p, 2000.

JUBB, K.V.F., KENNEDY, D.C., PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**, 4.ed, v. 1, Toronto: Academic Press, 780 p, 1991.

KARSTAD, L., KAMINJOLO, J.S. Skin papillomas in an impala (*Aepyceros melampus*) and a giraffe (*Giraffa camelopardalis*) **Journal of Wildlife Disease**, v. 14, p. 309-313, 1978.

KNOWLES, G., O'NEIL, B.W., CAMPO, M.S. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regression papillomas. **Journal Virology**, v. 70, p. 8451-8458, 1996.

KNOTTENBELT, D.C., PASCOE, R.R. Sistema tegumentar. In: **Afecções e Distúrbios do Cavalo**. São Paulo: Manole, 432 p, 1998.

LEAL, A.M., FERRAZ, O.P., CARVALHO, C., FREITAS, A.C., BENISTON, R.G., BEÇAK, W., CAMPO, M.S., STOCCO DOS SANTOS, R.C. Quercetin induces structural chromosome aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papilomavirus type 4. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, n. 1, p. 15-21, 2003.

LEE, C.P., CHEN, J.Y., WANG, J.T., KIMURA, K., TAKEMOTO, A., LU, C.C., CHEN, M.R. Epstein-Barr virus BGLF4 kinase induces premature chromosome condensation through activation of Condensin and Topoisomerase II. **Journal of Virology**, v. 81, n. 10, p. 5166-5180, 2007.

LEE, R., YAMADA, S., YAMAMOTO, N., MIYAMOTTO, T., ANDO, K., DURANTE, M., TSUJII, H. Chromosomal aberrations in lymphocytes of lung cancer patients treated with carbon ions. **Journal Radiation Research**, v. 45, p. 195-199, 2004.

LIOI, M.B., BARBIERI, R., BORZACCHIELLO, G., DEZZI, S., ROPERTO, S., SANTORO, A., RUSSO, V., ROPERTO, F. Chromosome aberrations in cattle with chronic enzootic haematuria. **Journal Comparative Pathologic**, v. 131, p. 233-236, 2004.

MAEDA, Y., SHIBAHARA, T., WADA, Y., KADOTA, K., KANNO, T., UCHIDA, I., HATAMA, S. An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p. 242-248, 2007.

MANNI, V., ROPERTO, F.D.I., GUARDO, G., GALATI, D., CONDOLEO, R.U., VENUTI, A. Presence of papillomavirus-like DNA sequences in cutaneous fibropapillomas of the goat udder. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 1-6, 1998.

MANSUR, C.P., ANDROPHY, E.J. Cellular transformation by papillomavirus oncoproteins. **Biochimic Biophysic Acta**, v. 1155, p. 323-345, 1993.

MARINS, R.S.Q.S. Epidemiologia da papilomatose cutânea bovina e avaliação da eficácia de diferentes tratamentos em microrregiões dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. Dissertação de Mestrado, Produção Animal, **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF**, Campos dos Goytacazes - RJ, 106 p, 2004.

MARINS, R.S.Q.S., TRAVASSOS, C.E.P.F., PEREIRA, S.R.F.G., PEREIRA, M.A.V.C., VIEIRA, L.F.P. Appraisal of efficiency of homeopathy and herbal therapy in the treatment of bovine cutaneous papillomatosis. **Brazilian Journal of Veterinary Science**, v. 13, p. 10-12, 2006.

MARINS, R.S.Q.S., TRAVASSOS, C.E.P.F., PEREIRA, S.R.F.G., SALES, L.G. Effectiveness of species-specific vaccine in the treatment of bovine cutaneous papillomatosis. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 27, p. 130-132, 2005.

MATUSHIMA, E.R., LONGATTO FILHO, A., DI LORETTO, C., KANAMURA, C.T., SINHORINI, I.L., GALLO, B., BAPTISTOLLE, C. Cutaneous papillomas of green turtles: a morphological, ultra-structural and immunohistochemical study in Brazilian specimens. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 51-54, 2001.

MAYR, A., GUERREIRO, M.G. **Virologia Veterinária**. 3.ed. Porto Alegre: editora sulina, 476 p, 1988.

MELLINK, C.N.M., BOSMA, A. A. The karyotype of the domestic dog (*Canine families L.*). In: Halnan, C.R.E. **Cytogenetics of Animals**, p.151-157, 1989.

Mc PHILLIPS, M.G., OLIVEIRA, J.G., SPINDLER, J.E., MITRA, R., McBRIDE A.A. Brd4 is required for E2-mediated transcriptional activation but not genome partitioning of all papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 80, n. 19, p. 9530 -9543, 2006.

MELLO, W.A. Investigação de papilomavírus em primatas não-humanos do Novo Mundo: ocorrência e caracterização molecular. Tese de Doutorado, Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, **Universidade Federal do Pará – UFP**, Belém, p. 115, 2005.

MEGID, J., DIAS JUNIOR, J.G., AGUIAR, D.M., NARDI JÚNIOR, G., SILVA, W.B., RIBEIRO, M.G. Tratamento da papilomatose canina com *Propionibacterium acnes*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 574-576, 2001.

MERCK, A. Sistema tegumentar. In: Aiello, S.E., Mays, A. (eds.) **Manual Merck de Veterinária**. 8. ed. São Paulo: Roca, p. 481-592, 2001.

MILLER, M.J.R., DAWSON, R.D., SCHWANTJE, H. Papillomavirus. In: *Manual of common diseases and parasites of wildlife in Northern British Columbia*, p.101-103, 2003., <[http://www.unbc.ca/nlul/wildlife\\_diseases\\_bc/papillomavirus.htm](http://www.unbc.ca/nlul/wildlife_diseases_bc/papillomavirus.htm)>, acesso em 28 de outubro de 2008.

MOENS, U., WOLD, I., MATHIESEN, S.D., JORGENSEN, T., SORENSEN, D., TRAAVIK, T. Parapoxvirus papillomatosis in the Muskoxen (*Ovibos moschatus*): genetical differences between the virus causing new outbreak in a vaccinated herd, the vaccine virus and a local orf virus. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 31, n. 1, p. 17-31, 1990.

MOULTON, J.E. **Tumors in Domestic Animals**. 3.ed. London: University of California Press, 672 p, 1990.

MOORE, R.A., WALCOTT, S., WHITE, K.L., ANDERSON, D.M., JAIN, S., LLOYD, A., TOPLEY, P., THOMSEN, L., GOUGH, G.W., STANLEY, M.A. Therapeutic immunization with COPV early genes by epithelial DNA delivery. **Virology**, v. 314, p. 630-635, 2003.

MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, W.J., BATTIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A. Chromosomes preparations leucocytes cultures from human peripheral blood. **Experimental Cells Research**, v. 20, p. 135-136, 1960.

MORENO-LOPEZ, J., AHOLA, H., STENLUND, A., OSTERHAUS, A., PETTERSSON, U. Genome of an Avian Papillomavirus. **Journal of Virology**, v. 51, n. 3, p. 872-875, 1984.

MURPHY, F.A., GIBBS, P.J., HORZINEK, M.C., STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**, 3.ed., Academic Press, 629 p, 1999.

NASIR, L., GAULT, E., MORGAN, I.M., CHAMBERS, G., ELLSMORE, V., CAMPO, M.S. Identification and functional analysis of sequence variants in the long control region and the E2 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 isolated from equine sarcoids. **Virology**, v. 364, p. 355-361, 2007.

NET, J.L., ORTH, G., SUNDBERG, J.P., CASSONNET, P., POISSON, L., MASSON, M.T., GEORGE, C., LONGEART, L. Multiple pigmented cutaneous papules associated with a novel canine papillomavirus in a immunosuppressed dog. **Veterinary Pathology**, v. 34, p. 8-14, 1997.

NICHOLAS, F.W. Cromosomas y aberraciones cromosómicas. In: **Genética Veterinária**, Nicholas (Ed.) Acribia: Zaragoza: España, p.103-159, 1997.

NICHOLLS, P.K., KLAUNBERG, B.A., MOORE, R.A., SANTOS, E.B., PARRYS, N.R., GOUGH, G.W., STANLEY, M.A. Naturally occurring, non regressing Canine Oral Papillomavirus infection: host immunity, virus characterization, and experimental infection. **Virology**, v. 265, p. 365-374, 1999.

NICHOLLS, P.K., MOORE, P.F., ANDERSON, D.M., MOORE, R.A., PARRY, N.R., GOUGH, G.W., STANLEY, M. Regression of canine oral papillomas is associated with infiltration of CD4+ and CD8+ lymphocytes. **Virology**, v. 283, p. 31 - 39, 2001.

NICOL, A. F. Avaliação da resposta immune celular do cérvix uterino em mulheres infectadas pelo vírus do papiloma humano (HPV) e co-infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Tese de Doutorado, Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz - IOC, **Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ**, 174 p., 2004

NGHIEM, P., PARK, P.K., KIM, Y-S., VAZIRI, C., SCHREIBER, S.L. ATR inhibition selectively sensitizes G1 checkpoint-deficient cells to lethal premature chromatin condensation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 16, p. 9092-9097, 2001.

OGAWA, T., TOMITA, Y., OKADA, M., SHINOZAKI, K., KUBONOYA, H., KAIHO, I., SHIRASAWA, H. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. **Journal of General Virology**, v. 85, p. 2191-2197, 2004.

OLIVEIRA, J.G., COLF, L.A., McBRIDE, A.A. Variations in the association of papillomavirus E2 proteins with mitotic chromosomes. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 4, p. 1047-1052, 2006.

OLSON, C., OLSON, R.O., HUBBARD-VAN, S. Variations of response of cattle to experimental induced papillomatosis. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v. 201, n. 1, p. 56-62, 1992.

OSTROW, R.S., McGLENNEN, R.C., SHAVER, M.K., KLOSTER, B.E., HOUSER, D., FARAS, A.J. A Rhesus monkey model for sexual transmission of a papillomavirus isolated from a squamous cell carcinoma. **Proceedings of National Academy Sciences**, v. 87, p. 8170-8174, 1990.

PARIS CONFERENCE (1971) Standardization in human cytogenetics. **Birth Defects Original Articles Series**, VIII: 7. The National Foundation, March of Dimes, New York, 1971.

PLOTON, D., MENAGER, M., JEANNESSON, P., HIMBER, G., PIGEON, F., ADNET, J.J. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic protein of the nucleolar organizer regions at the optical level. **Histochemical Journal**, v. 18, n. 1, p. 5-14, 1986.

RAO, P.N., SUNKARA, P.S., WRIGHT, D.A. Chromosome condensation factors of mammalian cells. In: Frances, E. Arright, Potu, N Rao, Elton Stubblefield (eds.). **Genes, chromosomes and neoplasia**, New York: Raven Press, p. 49-60, 1981.

REBHUN, W.C. Doenças das tetas e do úbere. In: Rebhun, E.C. (ed.) **Doenças do Gado Leiteiro**. São Paulo: Roca, p. 309-378, 2000.

RECTOR, A., BOSSART, G.D., GHIM, S-J., SUNDBERG, J.P., JENSON, A.B., RANST, M.V. Characterization of a novel close-to-root papillomavirus from a Florida Manatee by Using Multiply primed rolling-circle amplification: *Trichechus manatus latirostris papillomavirus* type1. **Journal of Virology**, v. 78 n. 22, p. 12698-12702, 2004.

RECTOR, A., DOORSLAER, K.V., BERTELSEN, M., BARKER, I.K., OLBERG, R.A., LEMEY, P., SUNDBERG, J.P., RANST, M.V. Isolation and cloning of the raccoon (*Procyon lotor*) papillomavirus type 1 by using degenerate papillomavirus-specific primers. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 2029-2033, 2005a.

RECTOR, A., LEMEY, P., TACHEZY, R., MOSTMANS, S., GHIM, S-J., VAN DOORSLAER, K., ROELKE, M., BUSH, M., MONTALI, R.J., JOSLIN, J., BURK, R.D., JENSON, A.B., SUNDBERG, J.P., SHAPIRO, B., VAN RANST, M. Ancient papillomavirus-host co-speciation in Felidae. **Genome Biology**, 8, p. 57, 2007.

RECTOR, A., MOSTMANS, S., DOORSLAER, K.V., McKNIGHT, C.A., MAES, R.K., WISE, A.G., KIUPEL, M., RANST, M.V. Genetic characterization of the first chiropteran papillomavirus, isolated from a basosquamous carcinoma in an Egyptian fruit bat: The *Rousettus aegyptiacus papillomavirus* type1. **Veterinary Microbiology**, v. 117, p. 267-275, 2006.

RECTOR, A., TACHEZY, R., DOORSLAER, K.V., MacNAMARA, T., BURK, R.D., SUNDBERG, J.P., RANST, M.V. Isolation and cloning of a papillomavirus from a North American porcupine by using multiply primed rolling-circle amplification: the *Erethizon dorsatum papillomavirus* type 1. **Virology**, v. 331, p. 449-456, 2005b.

RECOUSO, R.C., SANTOS, R.C.S., FREITAS, R., SANTOS, R.C., FREITAS, A. C., BRUNNER, O., BEÇAK, W., LINDSEY, C.J. Clastogenic effect of bracken fern (*Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum*) diet in peripheral lymphocytes of human consumers: preliminary data. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 1, p. 1-9, 2003.

REHTANZ, M., GHIM, S.J., RECTOR, A., RANST M.V., FAIR, P.A., BOSSART, G.D., JENSON, A.B. Isolation and characterization of the first American bottlenose dolphin papillomavirus: *Tursiops truncatus papillomavirus* type 2. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3559-3565, 2006.

REIMAN, N., BARTNITZKE, S., BULLERDLEK, J., SCHMITZ, U., ROGALLA, P., NOLTE, I., RONNE, M. An extended nomenclature of the canine karyotype. **Cytogenetic Cell Genetics**, v. 73, p. 140-144, 1996.

RICHARDSON, A. Chromosome analysis. In: **The ACT - Cytogenetics Laboratory Manual**, Barch, M.J (Ed.), 2.ed., Raven Press, New York, 1991.

ROMANOS, M.T.V., SANTOS, N.S.O., MIRANDA, M.M.F. Viroses Oncogênicas. In: **Introdução à virologia humana**. Santos, N.S.O, Romanos, M.T.V., Wigg, M.D. (eds.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 199-219, 2002.

SANTIN, A.P.I., BRITO, L.A.B. Caracterização anatomopatológica da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros. In: **XI Encontro Nacional de patologia veterinária**, São Paulo, p. 220, 2003.

SANTOS, N.S.O. Diagnóstico Laboratorial das viroses. In: **Introdução à virologia humana**. Santos, N.S.O., Romanos, M.T.V., Wigg, M.D. (eds.) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 31-46, 2002.

SCHULMAN, F.Y., KRAFFT, A.E., JANCZEWSKI, T. Feline cutaneous fibropapillomas: clinicopathologic findings and association with papillomavirus infection. **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 291-296, 2001.

SCHULMAN, F.Y., KRAFFT, A.E., JANCZEWSKI, T., REUPERT, R., JACKSON, K., GARNER, M.M. Camelid mucocutaneous fibropapillomas: Clinicopathologic findings and association with papillomavirus. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 103-107, 2003.

SILVA, L.A.F., JAYME, V.S., OLIVEIRA, M.A.B., EURIDES, D., FIORAVANTI, M.C.S., FILHO, F.C.D. Implante pedunculado de papilomas cutâneos e auto-hemoterapia no tratamento da papilomatose bovina. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 4, n. 1, p. 83-88, 1998.

SIRONI, G., CANAIATTI, M., SCANZIANI, E. Immunohistochemical detection of papillomavirus structural antigens in animal hyperplastic and neoplastic epithelial lesions. **Journal Veterinary Medicine**, v. 37, n. 10, p. 760-761, 1990.

SOBESTIANSKY, J., BARCELLOS, D.E.S.N., MORES, N., OLIVEIRA, S.J., CARVALHO, L.F.O.S., MORENO, A.M., ROEHE, P.M. Papilomatose. In: **Clínica e Patologia Suína**. 2.ed. Goiânia: Art 3 Impressos Especiais, 464 p, 1999.

SOUZA, G.A., TADINI, G.M., ZUCCARI, D.A.P.C., PROVAZZI, P.J.S., VILLA, L.L., TAJARA, E.H., RAHAL, P. Identifying a new canine papillomavirus. In: XIV Encontro Nacional de Virologia. Florianópolis. **Virus Reviews & Research**, v. 8, p. 169, 2003.

SOUZA, W.V. Estudo da intersexualidade em espécies domésticas. Tese de Mestrado, Patologia e Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária, **Universidade Federal Fluminense**, Niterói, p. 89, 2003.

STEVENS, H., RECTOR, A., BERTELSEN, M.F., LEIFSSON, P.S., VAN RANST, M. Novel papillomavirus isolated from the oral mucosa of a polar bear does not cluster with other papillomaviruses of carnivores. **Veterinary microbiology**, v. 129, p. 108-116, 2008.

STOCCO DOS SANTOS, R.C., LINDSEY, C.J., FERRAZ, O.P., PINTO, J.R., MIRANDOLA, R.S., BENESI, F.J., BIRGEL, E.H., PEREIRA, C. A. B., BEÇAK, W. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2127-2135, 1995.

STOCCO DOS SANTOS, R.C., BEÇAK, W., DINIZ, O., GARCIA, G.S., CARVALHO, C. Papilomavírus infecta 60% do rebanho bovino; <<http://www.estadao.com.br>> Acesso em 12 agos. 2005.

STUBBLEFIELD, E. The molecular organization of mamalian metaphase chromosomes. In: **Genes, Chromosomes and Neoplasia**. Francis Arrighi, Potu Rao e Elton Stubblefield (Eds.) Raven Press, New York. p. 61-74, 1981.

STURION, D.J., PARDO, P.E., TANAKA, N.M. Tratamento da papilomatose bovina com implante axilar. **Unimar Ciências**, v. 6, n. 2, p. 51-58, 1997.



SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cellular Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

SUNDBERG, J.P., MONTALI, R.J., BUSH, M., PHILLIPS, L.G., O'BRIEN, S.J., JENSON, A.B., BURK, R.D., VAN RANST, M. Papillomavirus-associated focal oral hyperplasia in wild and captive asian lions (*Panthera leo persica*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 27, p. 61-70, 1996.

SUNDBERG, J.P., VAN RANST, M., MONTALI, R., HOMER, B.L., MILLER, W.H., ROWLAND, P.H., SCOTT, D.W., ENGLAND, J.J., DUNSTAN, R.W., MIKAEIAN, I., JENSON, A.B. Feline papillomas and papillomaviruses. **Veterinary Pathology**, v. 37, p. 1-10, 2000.

SUZICH, J.A., GHIM, S., PALEMR-HILL, F.J., WHITE, W.I., TAMURA, J.K., BELL, J.A., NEWSOME, J.A., JENSON, A.B., SCHLEGEL, R. Systematic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. **Immunology**, v. 92, p. 11553-11557, 1995.

TACHEZY, R., RECTOR, A., HAVELKOVA, M., WOLLANTS, E., FITEN, P., OPDENAKKER, G., JENSON, A.B., SUNDBERG, J.P., VAN RANST, M. Avian papillomaviruses: the parrot *Psittacus erithacus papillomavirus* (PePV) genome has a unique organization of the early protein region and is phylogenetically related to the *Chaffinch papillomavirus*. **BMC Microbiology**, v. 2, p.1 9, 2002.

TANABE, C., KANO, R., NAGATA, M., NAKAMURA, Y., WATANABE, S., HASEGAWA, A. Molecular characteristics of cutaneous papillomavirus from the canine pigmented epidermal nevus. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 62, n. 11, p. 1189-1192, 2000.

TEIFKE, J.P., KIDNEY, B.A., LÖHR, C.V., YAGERS, J.A. Detection of papillomavirus-DNA in mesenchymal tumour cells and not in the hyperplastic epithelium of feline sarcoids. **Veterinary Dermatology**, v. 14, p. 47-56, 2003.

TERAI, M., DeSALLE, R., BURK, R.D. Lack of canonical E6 and E7 Open reading Frames in bird Papillomaviruses: *Fringilla coelebs* Papillomavirus and *Psittacus erithacus timneh* Papillomavirus. **Journal of Virology**, v. 76, n. 19, p.10020-10023, 2002.

TERZOUDI, G.I., PANTELIAS, G.E. Conversion of DNA damage into chromosome damage in response to cell cycle regulation of chromatin condensation after irradiation. **Mutagenesis**, v. 12, n. 47, p. 271-276 , 1997.

THOMPSON, D.A., BELINSKY, G., CHANG, T.H.T., JONES, D.L., SCHLEGEL, R., MUNGER, K. The human papillomavirus -16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. **Oncogene**, v. 15, p. 3031-3035, 1997.

THOMPSON, F.H. Cytogenetic methodological approaches and findings in human solid tumors. In: **The Act Cytogenetic Laboratory**. 2. ed., Margareth J. Barch (Ed.), p. 451-488, 1981.

TRIMBORN, M., BELL, S.M., FELIX, C., RASHID, Y., JAFRI, H., GRIFFITHS, P.D., NEUMANN, L.M., KREBS, A., REIS, A., SPERLING, K., NEITZEL, H., JACKSON, A. P. Mutations in Microcephalin cause aberrant regulation of chromosome condensation. **American Journal of Human Genetics**, v. 75, p. 261-266, 2004.

TSIRIMONAKI, E., O'NEIL, B.W., WILLIAMS, R., CAMPO, M.S. Extensive papillomatosis of the bovine upper gastrointestinal tract. **Journal Comparative Pathology**, v. 129, p. 93-99, 2003.

TOMITA, Y., OGAWA, Y., JIN, Z., SHIRASAWA, H. Genus specific features of bovine papillomavirus E6, E7, E5 e E8 proteins. **Virus Research**, v. 124, p. 231-236, 2007.

VAN DOORSLAER, K., RECTOR, A., VOS, P., RANST, M.V. Genetic characterization of the *Capra hircus* papillomavirus: A novel close-to-root artiodactyl papillomavirus. **Virus Research**, v. 118, p. 164-169, 2006.

VITOVEC, J., KERSA, J., KRATOCHVÍL, P., SKALOVÁ, A. Congenital fibropapillomatosis in a piglet. **Veterinary Pathology**, v. 36, p. 83-85, 1999.

WHITE, K.S., FUJI, R.N., VALENTINE, B.A., BILDFELL, R.J. Equine congenital papillomas: pathological findings and results of papillomavirus immunohistochemistry in five cases. **Veterinary Dermatology**, Corvallis, v. 15, p. 240-244, 2004.

WITTMANN, W. Infecções por papilomavírus. In: Beer, J (ed.) **Doenças Infeciosas em Animais Domésticos**. São Paulo: Roca, p. 316-261, 1999.

WOODRUFF, R.A., BONDE, R.K., ROMERO, C.H. Preliminary molecular characterization of Manatee papillomavirus from skin lesions of the Florida Manatee (*Trichechus manatus latirostris*) Florida Integrated Science Center; In: **International Association of Aquatic Animal Medicine Conference**, Waikaloa, Hawaii, 2003.

WOODRUFF, R.A., BONDE, R.K., BONILLA, J.A., ROMERO, C.H. Molecular identification of a papilloma virus from cutaneous lesions of captive and free-ranging Florida Manatees. **Journal of Wildlife Disease**, v. 41, p. 437-441, 2005.

YAGER, J.A., SCOTT, D.W. The skin and appendages. In: Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C., Palmer, N. (eds.) **Pathology of Domestic Animals**. 4.ed. Londres: Academic Press, p. 531-738, 1991.

YAGUIU, A., CARVALHO, C., FREITAS, A.C., GÓES, L.G.B., DAGLI, M.L.Z., BIRGEL Jr, E.H., BEÇAK, W., STOCCO DOS SANTOS, R.C. Papillomatosis in cattle: in situ detection of bovine papilomavírus DNA sequences in reproductive tissues. **Brazilian Journal Morphological Science**, v. 23, n. 3/4, p. 129-136, 2006.

YUANG, Z., PHILBEY, A.W., GAULT, E.A., CAMPO, M.S., NASIR, L. Detection of bovine papillomavirus type 1 genomes and viral gene expression in equine inflammatory skin conditions. **Virus Research**, v. 124, p. 245-249, 2007.

ZANINI, S.F., ZANINI, M.S., ROCHA, N.S., VERNECK, W.C., PEREIRA, T.D., CARVALHO, G.D., MASSENO, A.P.B., PAULA, W.P. Avaliação histopatológica de lesões cutâneas da papilomatose em bovinos submetidos à vacinação autógena. In: **XI Encontro Nacional de Patologia Veterinária**, São Paulo, p. 219, 2003.

## 10. APÊNDICES

### APÊNDICE A – Preparo das soluções de citogenética

#### Técnica de bandamento G

##### Solução Tamponada de Dulbecco

- Na Cl .....8,0 g
- Na PO<sub>4</sub>.....1,5 g
- KCl .....0,2 g
- KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> .....0,2 g
- H<sub>2</sub>O qsp .....1 litro

##### Solução Tampão Fosfato pH 6,8

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....6,808 g
- NaOH ..... .0,882g
- H<sub>2</sub>O qsp .....1 litro

##### Solução de Tripsina

- Tripsina em pó ..... 50 mg
- Solução de Dulbecco .....100 mL

##### Solução de Giemsa 3%

- Tampão fosfato pH 6,75 ..... 97 mL
- Giemsa ..... 3 mL

## Técnica de bandamento C

### Solução de Bário

- Ba (OH)<sub>2</sub>.....9 g
- H<sub>2</sub>O qsp.....180 mL

### Solução HCl 0,2N

- HCl .....10 mL
- H<sub>2</sub>O qsp..... 600 mL

### Solução Salina de Citrato

- Na Cl 0,3 M .....17,55 g
- Citrato de sódio 0,03 M .....8,82 g
- H<sub>2</sub>O qsp .....1 litro

### Solução Tampão Fosfato pH 6,8

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....6,808 g
- NaOH .....0,882g
- H<sub>2</sub>O qsp .....1 litro

### Solução Giemsa 2%

- Solução Tampão fosfato pH 6,75 .....98 mL
- Giemsa .....2 mL

## APÊNDICE B – Preparo das soluções de histopatologia

### Formol tamponado neutro a 10%

- Formol .....10 mL
- H<sub>2</sub>O qsp.....90 mL
- Fosfato de Sódio Monobásico.....4 g
- Fosfato de Sódio Dibásico.....6,5 g

### Solução de álcool amoniacal

- Amônia PA .....1,0 mL
- Álcool 75%.....200 mL

### Solução eosina estoque (Eosina alcólica 1%)

- Eosina .....10 g
- H<sub>2</sub>O qsp.....200 mL
- Álcool 95%.....800 mL

### Solução eosina para uso

- Eosina estoque.....10 mL
- Álcool 80%.....70 mL

### Solução hematoxilina estoque

- Álcool etílico 95%.....100 mL
- Hematoxilina.....2 g
- H<sub>2</sub>O qsp.....1000 mL
- Sulfato de alumínio/amônio.....20 g
- Óxido vermelho de mercúrio.....3 g
- Ácido acético.....3 mL

### Protocolo para remoção de pigmentos de formol das amostras

- Estufa a 60° C.....10 minutos
- Xilol – I.....03 minutos
- Xilol – II.....03 minutos
- Álcool absoluto – I.....01 minuto
- Álcool absoluto – II.....01 minuto
- Álcool absoluto – III.....01 minuto
- Água corrente.....01 minuto
- Água destilada.....01 minuto
- Álcool amoniacal.....30 minutos
- Água corrente.....10 minutos
- Água destilada..... 01 minuto
- Segue etapa de coloração

### Protocolo de coloração de rotina para H&E



- Estufa a 60° C.....10 minutos
- Xilol – I.....03 minutos
- Xilol – II.....03 minutos
- Álcool absoluto – I.....01 minuto
- Álcool absoluto – II.....01 minuto
- Álcool absoluto – III.....01 minuto
- Água corrente.....Banho
- Água destilada.....01 minuto
- Hematoxilina.....03 minutos
- Água corrente.....15 minutos
- Água destilada..... 01 minuto
- Álcool 70%.....01 minuto
- Eosina.....50 segundos
- Álcool absoluto – IV.....01 minuto
- Álcool absoluto – V.....01 minuto
- Álcool absoluto – VI.....01 minuto
- Álcool absoluto – VII.....01 minuto
- Álcool absoluto – VIII.....01 minuto

- Xilol – III.....03 minutos
- Xilol – IV.....03 minutos
- Montar com resina acrílica



## 11. ANEXOS

### ANEXO A – Protocolo de colheita do material

  <p><b>UENF</b> Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro</p> <p><b>CCTA-HV</b> Setor de Virologia e Virozes</p>
<p><b><u>ESTUDO DA INFECÇÃO CLÍNICA DE ANIMAIS PORTADORES DA PAPILOMATOSE</u></b></p> <p>▪ <b>AMOSTRAS DE LESÕES EPITELIAIS</b></p> <p>Colher assepticamente amostras de lesões de pele e/ou mucosa (cerca de três/animal) sugestivas de papilomatose com auxílio de bisturi.</p> <p>▪ <b>AMOSTRAS DE SANGUE</b></p> <p>Colher assepticamente amostras de sangue de animais portadores clinicamente de lesões sugestivas de papilomatose com auxílio de agulhas de vacutainer e tubos de ensaio vacutainer com EDTA e com HEPARINA ou seringas e agulhas de calibre de acordo com a espécie e transferidas imediatamente para os tubos contendo seus respectivos anticoagulantes.</p> <p><b><u>ESTUDO DA INFECÇÃO LATENTE VIRAL DE ANIMAIS ASSINTOMÁTICOS</u></b></p> <p>▪ <b>AMOSTRAS DE SANGUE</b></p> <p>Colher assepticamente amostras de sangue de animais assintomáticos de lesões sugestivas de papilomatose com auxílio de tubos de ensaio vacutainer com EDTA.</p>
<p>Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes / RJ - CEP: 28013-602 Tel.: (22) 2726-1500 Ramal 1701 - Fax: (22) 2726-1673 - e-mail: <a href="mailto:silviafqp@uenf.br">silviafqp@uenf.br</a></p>

**ANEXO B – Protocolo de conservação do material****UENF**

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

**CCTA-HV**

Setor de Virologia e Víruses

**ESTUDO DA INFECÇÃO CLÍNICA DE ANIMAIS PORTADORES DA PAPILOMATOSE****▪ AMOSTRAS DE LESÕES EPITELIAIS**

Conservar parte das lesões em formol neutro tamponado a 10%; outra parte em frasco coletor e manter em freezer na temperatura - 20°C e; parte das lesões em meio de cultura RPMI adicionando 10% de penicilina-estreptomicina e manter refrigerado.

**▪ AMOSTRAS DE SANGUE**

Conservar as amostras de sangue em tubos de ensaio vacutainer com EDTA em freezer na temperatura - 20°C e conservar as amostras de sangue em tubos de ensaio vacutainer com HEPARINA em geladeira na temperatura entre 4 a 8°C.

**ESTUDO DA INFECÇÃO LATENTE VIRAL DE ANIMAIS ASSINTOMÁTICOS****▪ AMOSTRAS DE SANGUE**

Conservar as amostras de sangue em tubos de ensaio vacutainer com EDTA em freezer na temperatura - 20°C.

**ANEXO C – Protocolo de transporte do material****UENF**

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

**CCTA-HV**

Setor de Virologia e Víruses

**ESTUDO DA INFECÇÃO CLÍNICA DE ANIMAIS PORTADORES DA PAPILOMATOSE****▪ AMOSTRAS DE LESÕES EPITELIAIS**

Transportar em isopor e/ou maleta térmica refrigerada as amostras conservadas apropriadamente, em fixador para técnica de histopatologia, em meio de cultura para técnica de citogenética e em temperaturas adequadas para estudos moleculares.



**▪ AMOSTRAS DE SANGUE**

Transportar em isopor e/ou maleta térmica refrigerada as amostras de sangue conservadas apropriadamente, em temperaturas adequadas para estudos moleculares e citogenéticos.

**ESTUDO DA INFECÇÃO LATENTE VIRAL DE ANIMAIS ASSINTOMÁTICOS****▪ AMOSTRAS DE SANGUE**

Transportar em isopor e/ou maleta térmica refrigerada as amostras de sangue conservadas apropriadamente, em temperaturas adequadas para estudos moleculares.

## ANEXO D – Documento de registro da procedência dos animais

	<b>UENF</b> Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro		<b>CCTA-HV</b> Setor de Virologia e Víruses
<b>DOCUMENTO DE REGISTRO</b>			
<b>DADOS DA PROPRIEDADE</b>			
Propriedade:		Local:	
Proprietário:		Clínica:	
Endereço:	Tel./Fax:	Número de exames no pedido:	
Médico veterinário responsável pela coleta:	CRMV:	Data da coleta:	
<b>DADOS DO ANIMAL</b>			
Espécie:	Sexo:	Raça:	
Nome e/ou número:	Idade:	Pelagem:	
Portador de papiloma: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Forma da Lesão: <input type="checkbox"/> Pedunculada <input type="checkbox"/> Plana <input type="checkbox"/> Mista		
Localização da lesão: <input type="checkbox"/> Cabeça <input type="checkbox"/> Focinho <input type="checkbox"/> Olhos <input type="checkbox"/> Mucosa oral <input type="checkbox"/> Pavilhão auricular <input type="checkbox"/> Naso-labial <input type="checkbox"/> Membros anteriores <input type="checkbox"/> Membros Posteriores <input type="checkbox"/> Dorso <input type="checkbox"/> Ventre <input type="checkbox"/> Abdômen <input type="checkbox"/> Genitália <input type="checkbox"/> Outros: _____			
Sintomas:	Medicamento:	Duração do tratamento:	
_____ de _____ de 20____			
_____ Assinatura do responsável			
<hr/> Av. Alberto Lamego, 2000 – Parque Califórnia – Campos dos Goytacazes / RJ – CEP: 28013-602 Tel.: (22) 2726-1500 Ramal 1701 – Fax: (22) 2726-1673 – e-mail: <a href="mailto:silviarfgp@uenf.br">silviarfgp@uenf.br</a>			

## ANEXO E – Requisição de exames

	 <b>UENF</b> Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro	<b>CCTA-HV</b> Setor de Virologia e Vírus
---	---	--

**REQUISIÇÃO DE EXAMES**

MATERIAL COLETADO		
▫ SANGUE COM HEPARINA	▫ SANGUE COM EDTA	▫ LESÃO PAPILOMA

BIOLOGIA MOLECULAR	HISTOPATOLOGIA	CITOGENÉTICA
▫ EXTRAÇÃO DO DNA	▫ MATERIAL FIXADO	▫ CULTURA DE UNFOCITOS LONGA DURAÇÃO
▫ PCR	▫ HISTOTÉCNICA	▫ CULTURA DE TECIDO NEOPLÁSICO
▫ SEQUENCIAMENTO	▫ ANÁLISE DAS LÂMINAS	▫ ANÁLISE DOS CROMOSSOMOS

**REQUISIÇÃO DE EXAMES**

MATERIAL COLETADO		
▫ SANGUE COM HEPARINA	▫ SANGUE COM EDTA	▫ LESÃO PAPILOMA

BIOLOGIA MOLECULAR	HISTOPATOLOGIA	CITOGENÉTICA
▫ EXTRAÇÃO DO DNA	▫ MATERIAL FIXADO	▫ CULTURA DE UNFOCITOS LONGA DURAÇÃO
▫ PCR	▫ HISTOTÉCNICA	▫ CULTURA DE TECIDO NEOPLÁSICO
▫ SEQUENCIAMENTO	▫ ANÁLISE DAS LÂMINAS	▫ ANÁLISE DOS CROMOSSOMOS

**REQUISIÇÃO DE EXAMES**



MATERIAL COLETADO		
▫ SANGUE COM HEPARINA	▫ SANGUE COM EDTA	▫ LESÃO PAPILOMA

BIOLOGIA MOLECULAR	HISTOPATOLOGIA	CITOGENÉTICA
▫ EXTRAÇÃO DO DNA	▫ MATERIAL FIXADO	▫ CULTURA DE UNFOCITOS LONGA DURAÇÃO
▫ PCR	▫ HISTOTÉCNICA	▫ CULTURA DE TECIDO NEOPLÁSICO
▫ SEQUENCIAMENTO	▫ ANÁLISE DAS LÂMINAS	▫ ANÁLISE DOS CROMOSSOMOS




Av. Alberto Lamego, 2000 – Parque Califórnia – Campos dos Goytacazes / RJ – CEP: 28013-602  
 Tel.: (22) 2726-1500 Ramal 1701 – Fax: (22) 2726-1673 – e-mail: [silviarfp@uenf.br](mailto:silviarfp@uenf.br)

## ANEXO F – Ficha dos animais

		<b>CCTA-HV</b> Setor de Virologia e Vírus
<b>UENF</b> Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro		
<b>DADOS DO ANIMAL</b>		
Espécie:	Sexo:	Raça:
Nome e/ou número:	Idade:	Pelagem:
Portador de papiloma: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Forma da Lesão: <input type="checkbox"/> Pedunculada <input type="checkbox"/> Plana <input type="checkbox"/> Mista	
Localização da lesão: <input type="checkbox"/> Cabeça <input type="checkbox"/> Focinho <input type="checkbox"/> Olhos <input type="checkbox"/> Mucosa oral <input type="checkbox"/> Pavilhão auricular <input type="checkbox"/> Naso-labial <input type="checkbox"/> Membros anteriores <input type="checkbox"/> Membros Posteriores <input type="checkbox"/> Dorso <input type="checkbox"/> Ventre <input type="checkbox"/> Abdômen <input type="checkbox"/> Genitália <input type="checkbox"/> Outros: _____		
Sintomas:	Medicamento:	Duração do tratamento:
<b>DADOS DO ANIMAL</b>		
Espécie:	Sexo:	Raça:
Nome e/ou número:	Idade:	Pelagem:
Portador de papiloma: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Forma da Lesão: <input type="checkbox"/> Pedunculada <input type="checkbox"/> Plana <input type="checkbox"/> Mista	
Localização da lesão: <input type="checkbox"/> Cabeça <input type="checkbox"/> Focinho <input type="checkbox"/> Olhos <input type="checkbox"/> Mucosa oral <input type="checkbox"/> Pavilhão auricular <input type="checkbox"/> Naso-labial <input type="checkbox"/> Membros anteriores <input type="checkbox"/> Membros Posteriores <input type="checkbox"/> Dorso <input type="checkbox"/> Ventre <input type="checkbox"/> Abdômen <input type="checkbox"/> Genitália <input type="checkbox"/> Outros: _____		
Sintomas:	Medicamento:	Duração do tratamento:
<b>DADOS DO ANIMAL</b>		
Espécie:	Sexo:	Raça:
Nome e/ou número:	Idade:	Pelagem:
Portador de papiloma: <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Forma da Lesão: <input type="checkbox"/> Pedunculada <input type="checkbox"/> Plana <input type="checkbox"/> Mista	
Localização da lesão: <input type="checkbox"/> Cabeça <input type="checkbox"/> Focinho <input type="checkbox"/> Olhos <input type="checkbox"/> Mucosa oral <input type="checkbox"/> Pavilhão auricular <input type="checkbox"/> Naso-labial <input type="checkbox"/> Membros anteriores <input type="checkbox"/> Membros Posteriores <input type="checkbox"/> Dorso <input type="checkbox"/> Ventre <input type="checkbox"/> Abdômen <input type="checkbox"/> Genitália <input type="checkbox"/> Outros: _____		
Sintomas:	Medicamento:	Duração do tratamento:

Av. Alberto Lamego, 2000 – Parque Califórnia – Campos dos Goytacazes / RJ – CEP: 28013-602  
Tel.: (22) 2726-1500 Ramal 1701 – Fax: (22) 2726-1673 – e-mail: [silviarfp@uenf.br](mailto:silviarfp@uenf.br)

## ANEXO G – Identificação das amostras

		
<b>UENF</b> Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro	<b>CCTA-HV</b> Setor de Virologia e Vírus	

---

**MATERIAL COLETADO**

SANGUE COM HEPARINA     
  SANGUE COM EDTA     
  LESÃO PAPILOMA

**IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS – SANGUE COM HEPARINA – CITOGÊNÉTICA**

01		11	
02		12	
03		13	
04		14	
05		15	
06		16	
07		17	
08		18	
09		19	
10		20	

**IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS – SANGUE COM EDTA - MOLECULAR**

01		11	
02		12	
03		13	
04		14	
05		15	
06		16	
07		17	
08		18	
09		19	
10		20	

**IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS – LESÃO PAPILOMA - HISTOPATOLOGIA**

01		11	
02		12	
03		13	
04		14	
05		15	
06		16	
07		17	
08		18	
09		19	
10		20	

---

Av. Alberto Lamego, 2000 – Parque Califórnia – Campos dos Goytacazes / RJ – CEP: 28013-602  
 Tel.: (22) 2726-1500 Ramal 1701 – Fax: (22) 2726-1673 – e-mail: [silviarfgp@uenf.br](mailto:silviarfgp@uenf.br)