

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Biotecnologia para Saúde – Vacinas e Biofármacos**

Gabrielly dos Santos Nascimento Matos

**Detecção de papilomavírus bovino (BPV) em amostras de caprinos
provenientes do estado do Pernambuco**

**São Paulo
2024**

Gabrielly dos Santos Nascimento Matos

**Detecção de papilomavírus bovino (BPV) em amostras de caprinos
provenientes do estado do Pernambuco**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para Saúde - Vacinas e Biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia.

Orientador (a): Rodrigo Franco De Carvalho

São Paulo

2024

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Matos, Gabrielly dos Santos Nascimento

Detecção de Papilomavírus Bovino (BPV) em Amostras de Caprinos Provenientes do Estado do Pernambuco / Gabrielly dos Santos Nascimento Matos ; orientador(a) Rodrigo Franco de Carvalho - São Paulo, 2024.

36 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Papilomavírus 2. BPV. 3. Caprinos I. Carvalho, Rodrigo Franco de. II. Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Gabrielly dos Santos Nascimento Matos, aluno(a) do Curso de Especialização em Biotecnologia – Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses
- Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 24 de Janeiro de 2024

Gabrielly d. S. N. Matos
aluno(a)

[Assinatura]

De acordo:.....
Orientador(a):

Dedico ao Gabriel. Sem o seu apoio e incentivo eu não teria conseguido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois tudo o que eu sou, o que quero ser e o que eu planejo ser, pertence a Ele e só a Ele.

Agradeço ao meu esposo Gabriel, pelo suporte constante e por não me deixar desistir pelo cansaço.

Agradeço aos meus pais Lina e Juraci, que mesmo longe sempre acreditaram e torceram por mim.

Agradeço aos meus amigos: Augusto, Domênica e Gabriela, vocês nem imaginam a força que me deram nesse período, vocês são meu Provérbios 17:17.

Agradeço a todos os meus adolescentes do GMA, receber o carinho e abraço de vocês a cada sábado me deu forças para ser a "*Viceteen cientista*" de vocês.

Agradeço ao Dr. Rodrigo Franco de Carvalho por toda orientação e novos aprendizados.

Agradeço aos pesquisadores da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pela colaboração e parceria no projeto.

Agradeço a Dra. Noemi Furuyama, por cuidar tão bem de mim e me ensinar tanto.

Agradeço ao Dr. Marcelo Palma Sircili pela oportunidade e por sempre exigir mais de cada um de nós.

Agradeço a Michele e ao Vinicius, que se tornaram bons amigos e viveram comigo momentos importantes e difíceis, obrigada por estarem comigo do começo ao fim.

Agradeço a Tatiane e Youko, as melhores técnicas que eu já conheci e que me garantiram as melhores risadas.

Agradeço a todos do Laboratório de Genética que me ensinaram tanto academicamente quanto para a vida.

Este trabalho teve apoio financeiro da Secretaria da Saúde do Governo do Estado de São Paulo.

“O mundo microscópico é um oceano de mistérios, onde cada descoberta é uma pérola preciosamente revelada.”

Rosalind Franklin

RESUMO

MATOS, Gabrielly dos Santos Nascimento. **Detecção de papilomavírus bovino (BPV) em amostras de caprinos provenientes do estado de Pernambuco**. 2024. 36 p. Trabalho de Conclusão de Curso Especialização em Biotecnologia para Saúde - Vacinas e Biofármacos – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024

Os papilomavírus (PVs) representam um grupo diverso de vírus, com cerca de 55-60nm de diâmetro e genoma composto por DNA circular e fita dupla, variando de 7000 pb a 8600 pb. Embora a maioria dos tipos já descritos seja encontrada em seres humanos, PVs já foram identificados em outros hospedeiros, com destaque para as espécies domésticas, aves e répteis. De maneira geral, os PVs são espécie-específicos, sendo restritos a uma espécie de hospedeiro. Entretanto, o papilomavírus bovino (BPV) tem se destacado por infectar diferentes espécies, para além de seu hospedeiro original. O presente estudo teve como objetivo realizar o diagnóstico molecular de PVs a partir de amostras de lesões cutâneas de caprinos (*Capra aegagrus hircus*). Foram coletadas lesões de sete caprinos, provenientes do Estado de Pernambuco. O material clínico foi submetido à extração do DNA e reações de PCR com a utilização do conjunto de iniciadores FAP 59/64. O material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose e a banda equivalente foi purificada e clonada em vetor bacteriano, utilizando-se células competentes (*E. coli*, linhagem DH5 α). A partir da seleção das colônias, foi realizada a extração dos plasmídeos recombinantes, sendo purificados e submetidos à digestão para checagem da presença do inserto. Após, amostras dos plasmídeos foram encaminhadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo para a realização do sequenciamento de DNA. As sequências geradas foram comparadas em banco de dados público (NCBI) para a sua identificação. Até o presente momento, foram identificadas quatro sequências virais em amostras de DNA correspondentes a três animais, incluindo dois supostos novos tipos de BPV, além da coinfeção pelos tipos BPV5 e BPV13. Até onde estamos cientes, este trabalho relata a primeira descrição de sequências do papilomavírus bovinos (BPV) em caprinos.

Palavras-chave: Papilomavírus. BPV. Caprinos. Interespécies. “One Health”.

ABSTRACT

MATOS, Gabrielly dos Santos Nascimento. **Detection of bovine papillomavirus (BPV) in samples from goats from the state of Pernambuco.** 2024. 36 p. Monograph (Specialist in Biotechnology for Health: Vaccines and Biopharmaceuticals) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

Papillomaviruses (PVs) represent a diverse group of viruses, with approximately 55-60nm in diameter and a genome composed of circular double-stranded DNA, ranging from 7,000bp to 8,600bp. Although most types have been described in humans, PVs have been identified in other hosts, particularly domestic species, birds, and reptiles. Generally, PVs are species-specific, restricted to a host species. However, bovine papillomavirus (BPV) stands out for infecting different species beyond its original host. This study aimed to perform the molecular diagnosis of PVs from skin lesion samples of goats (*Capra aegagrus hircus*). Lesions from seven goats from the state of Pernambuco were collected. The clinical material underwent DNA extraction, PCR reactions using the FAP 59/64 primer set and agarose gel electrophoresis. The corresponding band was purified and cloned into a bacterial vector using competent cells (*E. coli*, strain DH5 α). After colony selection, recombinant plasmids were extracted, purified, and subjected to digestion to check for the presence of the insert. Subsequently, plasmid samples were sent to the Human Genome Studies Center at the University of São Paulo for DNA sequencing. The generated sequences were compared to a public database (NCBI) for identification. So far, four viral sequences have been identified in DNA samples corresponding to three animals, including two putative new types of BPV, in addition to co-infection with BPV5 and BPV13 types. To the best of our knowledge, this work reports the first description of bovine papillomavirus (BPV) sequences in goats.

Keywords: Papillomavirus. BPV. Goats. Inter-species. One Health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Árvore filogenética dos papilomavírus	15
Figura 2 - Mapa genômico do BPV1	18
Figura 3 - Morfologia dos papilomavírus	19
Figura 4 - Mapa do vetor pGEM®-T Easy	23
Figura 5 - Digestão de plasmídeos com a enzima de restrição NotI	23
Figura 6 - Macroscopia das lesões do animal 210	25
Figura 7 - Macroscopia das lesões do animal "Baleia"	26
Figura 8 - Macroscopia das lesões do animal 212	27
Figura 9 - Exemplo de alinhamento das sequências de DNA	27
Figura 10 - Árvore filogenética dos tipos e supostos tipos identificados	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Demonstração da quantidade utilizada de cada reagente na PCR21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPV – papilomavírus bovino ou *Bos taurus papillomavirus*

DNA – ácido desoxirribonucleico

E – proteínas precoces (*early*)

E. coli – *Escherichia coli*

HPV – papilomavírus humano

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses

L – proteínas tardias (*late*)

LCR – *long control region*

NCBI – National Center for Biotechnology Information

ORF – *open reading frame* (quadro aberto de leitura)

pb – pares de base

PBS - tampão fosfato-salino

PCR – reação em cadeia da polimerase

PV – papilomavírus

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUMÁRIO

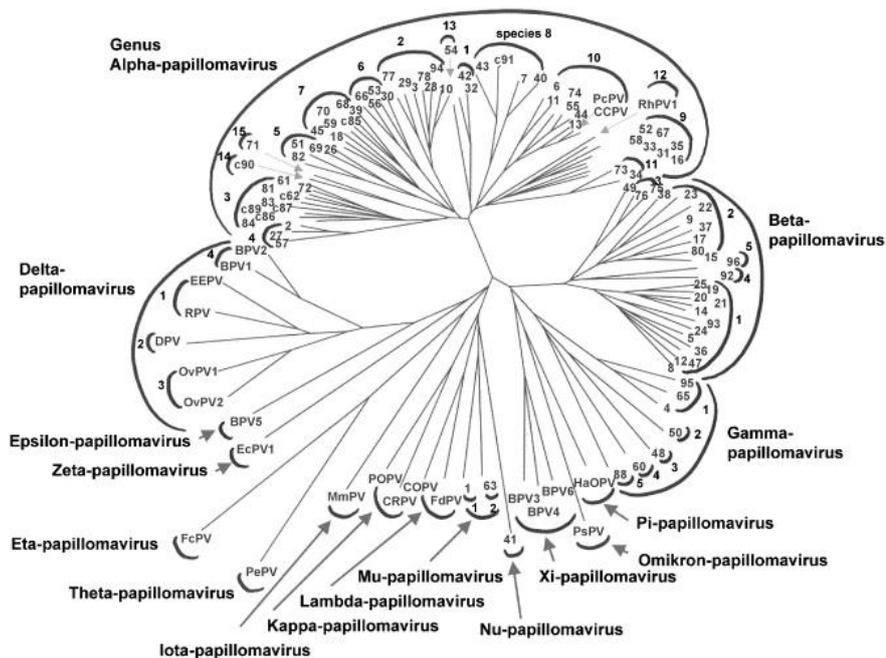
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Papilomavírus	15
1.1.1 Organização genômica.....	15
1.1.2 Infecção pelos papilomavírus.....	16
1.1.3 Epidemiologia.....	17
1.2 Papilomavírus bovino (BPV)	17
1.3 Métodos de detecção viral	18
2 OBJETIVOS	21
2.1 Geral	21
2.2 Específicos	21
3 METODOLOGIA	22
3.1 Diagnóstico Molecular das lesões de caprinos	22
3.1.1 Obtenção das amostras de lesões de caprinos	22
3.1.2 Extração do DNA	22
3.1.3 Diagnóstico por PCR	22
3.1.4 Eletroforese	23
3.1.5 Purificação dos produtos de PCR.....	23
3.1.6 Clonagem	23
3.1.7 Extração/Purificação do DNA plasmidial	24
3.1.8 Digestão	24
3.1.9 Sequenciamento dos produtos de PCR.....	25
4 RESULTADOS	26
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 Papilomavírus

Os papilomavírus (PVs) representam um grupo diverso de vírus, com cerca de 55-60nm de diâmetro composto por DNA circular e fita dupla (Antonsson & Hansson, 2002). Capazes de infectar e causar lesões na pele e mucosas, pertencem à família *Papillomaviridae*, composta por 53 gêneros e que atualmente possui 280 tipos diferentes descritos e classificados de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) (Bernard et al., 2010). Embora a maior parte dos tipos tenham sido encontrados em humanos, 64 tipos de PVs já foram identificados em outros hospedeiros como mamíferos não-humanos, com destaque para as espécies domésticas, aves e répteis (Munday, 2014).

Figura 1 - Árvore filogenética dos papilomavírus



Fonte: Adaptado de De Villiers et al., 2004.

1.1.1 Organização genômica

Os genomas dos papilomavírus variam de 7.000pb a 8.600pb, sendo divididos em três regiões: *early* (E), *late* (L) e *long coding region* (LCR), incluindo respectivamente as matrizes de leitura (ORFs) de transcrição precoce, que codifica

genes para proteínas não estruturais, de transcrição tardia, que codifica genes para proteínas do capsídeo, e a região de controle transcricional (Van Doorslaer, 2013).

A região E é predominantemente transcrita logo após a infecção pelo vírus, gerando transcritos denominados E1-E9, os quais estão associados à replicação do vírus e à transformação celular (causada pela ação das oncoproteínas virais equivalentes), variando de acordo com o tipo viral (De Villiers et al., 2004; Eriksson et al., 1994).

Em conjunto com a ORF L2, a ORF L1 codifica as informações necessárias para a estruturação do capsídeo viral, sendo ambas consideradas genes de transcrição tardia. Complementarmente, a ORF L1 equivale à região mais conservada do genoma, sendo tradicionalmente utilizada na identificação de novos tipos de PV. Neste sentido, considera-se que divergências de sequência que abranjam mais de 10% do tipo de PV mais próximo, previamente identificado, indicariam um suposto novo tipo viral. Já as diferenças entre 2% e 10% correspondem a um subtipo e de menos de 2%, uma variante (De Villiers et al., 2004).

1.1.2 Infecção pelos papilomavírus

Diferentes tipos de PVs podem levar a lesões hiperplásicas, desde verrugas benignas até neoplasias anogenitais, papilomas nas regiões de orofaringe e esofaringe, infecções na conjuntiva, cânceres de bexiga, fibromas e sarcomas (Carr; Gyorfí, 2000; Olson et al., 1959; Hausen, 1996, 2000).

No início da infecção por papilomavírus, a interação molecular entre as proteínas virais, especialmente a proteína L1, e os receptores na membrana da célula hospedeira desencadeia a adsorção da partícula viral à superfície celular. Este processo é importante para a internalização, frequentemente mediada por endocitose. Durante a internalização, o envelope viral é removido, expondo o capsídeo contendo o material genético. O desnudamento do genoma viral ocorre, permitindo que o DNA entre em contato direto com os genomas das células hospedeiras. Esse contato dá início a replicação viral, influenciando a maquinaria celular para a produção de novas partículas virais. A replicação do DNA viral ocorre nas células descendentes que, influenciadas por oncogenes virais, podem vir a gerar tumores. Devido a renovação natural do tecido, as células infectadas com DNA viral movem-se em direção ao epitélio estratificado, expressam proteínas estruturais e liberam novas partículas virais (Brimer et al., 2012; Doorbar, 2005).

Infecções por PVs podem desencadear uma resposta imune no hospedeiro, geralmente levando à regressão da doença (Borzacchiello; Roperto, 2008). Contudo, em alguns casos, proliferações papilomatosas podem evoluir para lesões malignas (tumores), frequentemente associadas à ação de cofatores ambientais, bem como ao estado fisiológico do hospedeiro (De Villiers et al., 2004; Leal et al., 2003).

1.1.3 Epidemiologia (Papilomatose Bovina)

A papilomatose é uma condição globalmente distribuída, predominantemente representada por infecções latentes de PV (Miller et al., 2003). É descrita em várias espécies de animais domésticos como bovinos, equinos, caprinos, ovinos, caninos e, raramente em felinos (Marins et al., 2004), mas acomete principalmente bovinos leiteiros. Em 75-80% dos casos, a doença é autolimitante, regredindo espontaneamente em até 18 meses, mesmo sem tratamento, sendo que a imunidade pós-recuperação dura de dois a três meses (Jubb et al., 1991; Gründer, 1993). No Brasil, a situação epidemiológica precisa da papilomatose bovina, especialmente os tipos virais prevalentes, permanece desconhecida (Stocco dos Santos, 2003; Marins et al., 2004).

A transmissão natural ocorre principalmente por contato direto entre animais ou indireto através de objetos contaminados (Blood; Radostits, 1991; Murphy et al., 1999; Miller et al., 2003). A transmissão sexual é possível, afetando a reprodução, e estudos indicam a presença de DNA do BPV em tecidos reprodutivos e gametas (Carvalho et al., 2003). A transmissão horizontal e mamária também foi documentada (Stocco dos Santos et al., 1998; Rebhun, 2000).

Já a transmissão interespecíes é rara, mas alguns PVs de animais podem replicar em hospedeiros heterólogos (Chan et al., 1997). Não há registro de HPV em animais ou de PVs de espécies animais em humanos. Embora não haja evidência conclusiva de transmissão do BPV para humanos, casos isolados foram relatados (Mayr; Guerreiro, 1988; Murphy et al., 1999; Stocco dos Santos et al., 2003).

1.2 Papilomavírus bovino (BPV)

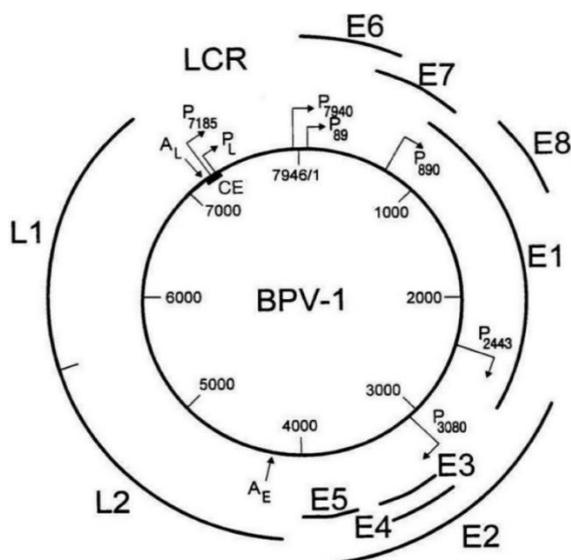
De maneira geral, os PVs são espécie-específicos, sendo restritos a uma espécie de hospedeiro. Entretanto, o papilomavírus bovino (BPV) tem se destacado por possuir tipos virais capazes de infectar diferentes espécies, para além de seu

hospedeiro original, conseguindo, assim, infectar bubalinos, equinos e ovinos (Mazzuchelli-de-Souza et al., 2018; Hatama, 2012; Campo, 2006).

Atualmente, os BPVs estão classificados em cinco gêneros: *Deltapapilomavirus* (BPV1, 2, 13 e 14), *Xipapilomavirus* (BPV3, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 15,17, 20, 23 e 24), *Epsilonpapilomavirus* (BPV5 e 8), *Dyoxipapilomavirus* (BPV7) e *Dyokapapilomavirus* (BPV16, 18 e 22). Os BPVs 19 e 21 ainda não estão classificados (Roperto et al., 2018).

Em bovinos, a infecção pelo BPV pode vir a resultar em verrugas cutâneas (BPV-1 e -2), papilomatose e câncer do trato gastrointestinal superior (BPV-4), papilomatose de tetos e úbere (BPV-1, -5 e -6), pênis (BPV-1), e câncer de bexiga (BPV-1 e -2) (Campo, 1997). Complementarmente, tipos de BPV também já foram identificados em amostras de tecidos saudáveis, sendo que o significado clínico destas infecções é incerto.

Figura 2 - Mapa genômico do BPV1



Fonte: Adaptado de Howley & Lowy, 2001.

1.3 Métodos de detecção viral

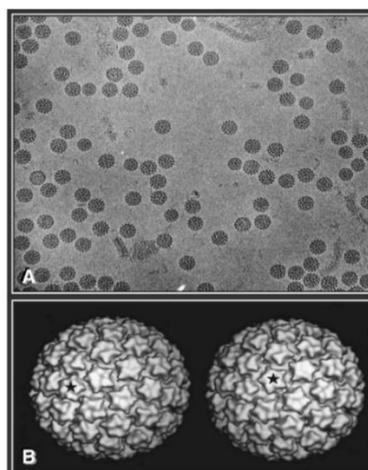
Devido à dificuldade em se realizar o isolamento viral *in vitro* (Wosiacki et al., 2005), os primeiros diagnósticos de infecções por PVs basearam-se nos achados histológicos das lesões e nas alterações da morfologia celular. No entanto, com a

ampla aplicação de técnicas de biologia molecular, especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), estabeleceu-se um novo padrão para a identificação viral de PVs. A PCR, altamente sensível, possibilita a detecção de uma única cópia do genoma por célula (Shamanin; Delius; De Villiers, 1994). Posteriormente, o sequenciamento de DNA aprimora a precisão na genotipagem e identificação de microrganismos, sendo um método confiável desde que bem padronizado (Gharizadeh et al., 2003).

Para a detecção ampla de sequências de DNA de PVs desconhecidas, vários iniciadores genéricos são utilizados. O par de iniciadores FAP59/FAP64 (Forslund et al., 1999; Ogawa et al., 2004) foi desenvolvido para amplificar regiões conservadas do gene L1 do HPV, detectando o vírus em tumores cutâneos ou tecidos normais. Além disso, iniciadores específicos para tipos de BPV, como por exemplo para o BPV2, têm sido empregados na detecção dessas sequências virais em diferentes amostras biológicas (De Carvalho et al., 2003; Campos et al., 2008; Lindsey et al., 2009).

A detecção de BPV com iniciadores específicos abrange uma variedade de amostras biológicas, como verrugas, sangue periférico, plasma, gametas, esperma, placenta, líquido amniótico, leite, colostro (Freitas et al., 2007; Lindsey et al., 2009; Stocco dos Santos et al., 1998), incluindo a identificação de BPV em sarcóides equinos (Nasir; Reid, 1999).

Figura 3 - Morfologia dos papilomavírus



A) Micrografia eletrônica de virions do BPV1. B) Imagens tridimensionais de papilomavírus. Capsômeros individuais aparecem em pentâmeros (marcado com asterisco à esquerda) ou hexâmetros (marcado com asterisco à direita). **Fonte:** Adaptado de Howley & Lowy, 2001.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente estudo teve como objetivo realizar o diagnóstico molecular e tipagem de PVs a partir de amostras de lesões cutâneas de caprinos (*Capra aegagrus hircus*).

2.2 Específicos

- a) Analisar a presença de papilomavírus bovino (BPV) em lesões de animais com papilomatose.
- b) Investigar a presença concomitante de distintos tipos de BPV em uma mesma lesão.

3 METODOLOGIA

3.1 Diagnóstico Molecular das lesões de caprinos

3.1.1 Obtenção das amostras de lesões de caprinos

Foram obtidas amostras de lesões cutâneas de sete caprinos, provenientes de localidades do Estado de Pernambuco, Brasil, em colaboração com os pesquisadores do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Rural de Pernambuco. O material clínico foi encaminhado ao laboratório de Genética do Instituto Butantan.

3.1.2 Extração do DNA

Foi triturado 25mg de cada amostra em tubos de fundo circular, diluindo-se o material obtido em 200µl de PBS, sendo o DNA total extraído por kit comercial (*Wizard Genomic DNA Purification*, Promega), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração do DNA, foi avaliada a concentração e pureza das amostras com auxílio do espectrofotômetro.

3.1.3 Diagnóstico por PCR

Foram realizadas reações de PCR visando à amplificação de um segmento de 500 pares de base do gene L1 pela utilização do conjunto de iniciadores genéricos FAP 59/64. As reações de amplificação foram preparadas em volume total de 25µl (Tabela 1).

Tabela 1 - Demonstração da quantidade utilizada de cada reagente na PCR

dH2O	17,0 µl
Buffer	2,5 µl
Mgcl2	0,75 µl
dNTPs	0,5 µl
Primer 1	1,25 µl
Primer 2	1,25 µl
TAQ polimerase	0,75 µl
amostra	1,0 µl
	25,0 µl

Fonte: Matos, Gabrielly, 2023 (Comunicação pessoal)

As ampliações foram realizadas de acordo com os seguintes parâmetros: inicialização por 3 minutos a 94°C; 40 ciclos para desnaturação por 1 minuto a 94°C, anelamento por 1 minuto a 53°C, extensão por 1 minuto a 72°C; e extensão final por 5 minutos a 72°C.

3.1.4 Eletroforese

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium). Foi utilizado o marcador *1 Kb Plus DNA Ladder* (Thermo), na proporção de 9µl de água, 2µl de azul de corrida e 1µl de marcador, e, em cada poço de amostragem, acrescentados 25µl de amostra juntamente com 5µl de azul de corrida *6x Load Dye* (Promega). As bandas equivalentes ao produto amplificado foram evidenciadas sob luz ultravioleta em transiluminador.

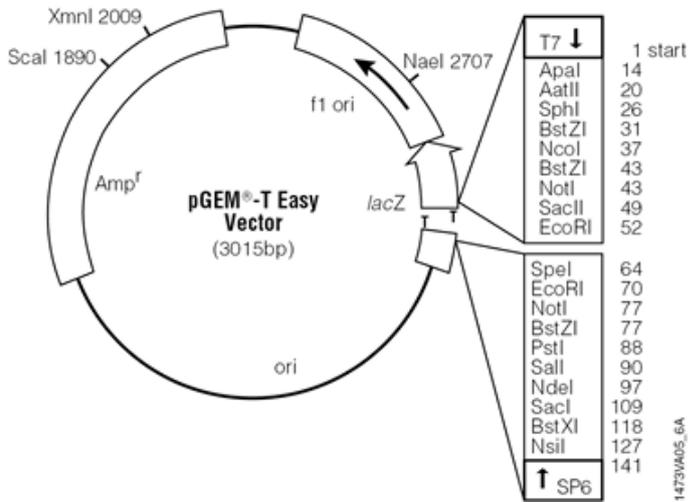
3.1.5 Purificação dos produtos de PCR

As bandas correspondentes foram excisadas do gel com auxílio de bisturi para a purificação do material genético através do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), seguindo as orientações do fabricante. Os produtos da purificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium).

3.1.6 Clonagem

O produto purificado foi posteriormente clonado em vetor bacteriano, através do sistema seletivo *pGEM-T Easy Vector* (Promega), seguindo as orientações do fabricante e utilizando-se células bacterianas competentes (*E. coli*, linhagem DH5α). As amostras foram plaqueadas em meio seletivo *imMedia AmpBlue* (Invitrogen), e mantidas em estufa por um período mínimo de 12 horas (*overnight*), sendo, após, foram selecionadas as colônias recombinantes pela sua cor (colônias brancas).

Figura 4 - Mapa do vetor pGEM®-T Easy



Fonte: Promega

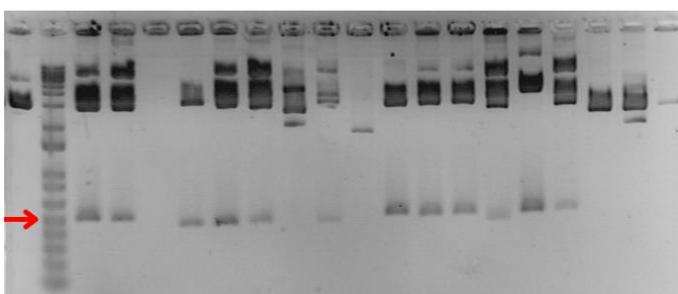
3.1.7 Extração/Purificação do DNA plasmidial

A partir da seleção das colônias bacterianas clonadas, foi realizada a extração dos plasmídeos recombinantes através do kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo as orientações do fabricante.

3.1.8 Digestão

Os plasmídeos purificados foram submetidos à digestão pela enzima de restrição *NotI*, conforme as orientações do fabricante (NEB). A digestão foi realizada utilizando o Termociclador MJ PTC-100 e o parâmetro selecionado foi de 37°C por 15 minutos. Para checagem da presença do inserto, submetemos as amostras à eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Figura 5 - Digestão de plasmídeos com a enzima de restrição *NotI*



Método utilizado para verificação da presença de sequências clonadas amplificadas com aproximadamente 500 pb (marcador molecular: 1 Kb Plus DNA Ladder). **Fonte:** Matos, Gabrielly, 2023 (Comunicação pessoal)

3.1.9 Sequenciamento dos produtos de PCR

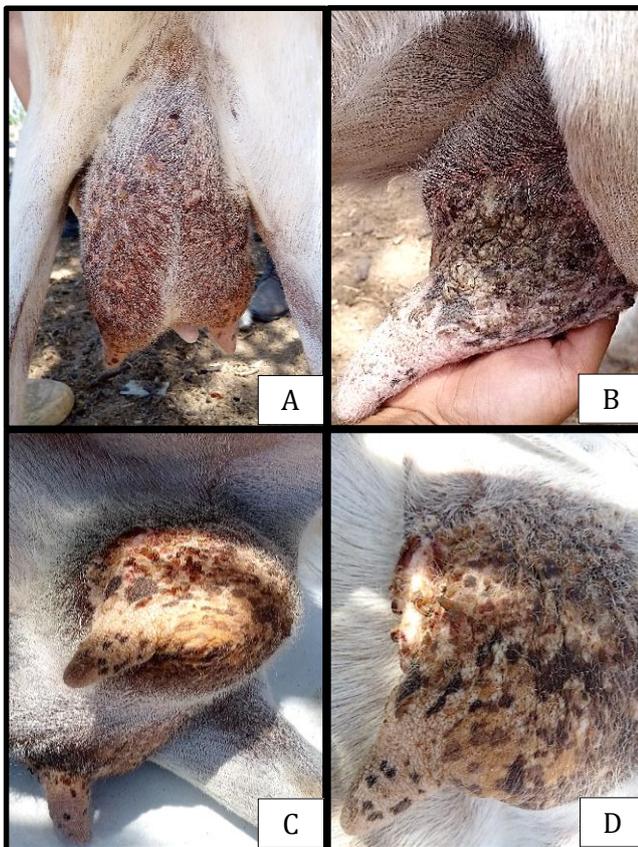
Após, as amostras de plasmídeos purificados foram encaminhadas para o Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo para a realização do sequenciamento de DNA, com a geração da sequência correspondente ao amplificado. As sequências geradas foram então submetidas à edição através do software *Bioedit*, incluindo o seu alinhamento e tradução, para, então, serem comparadas em banco de dados público (NCBI) para a sua identificação. Análises de inferência filogenética foram realizadas complementarmente com software *MEGA11*.

4 RESULTADOS

Até o momento, quatro sequências virais foram identificadas em amostras de DNA provenientes de três animais distintos.

Foi identificado no animal 210 (Figura 6) a presença de um provável novo tipo de papilomavírus, demonstrando uma proximidade filogenética com o suposto tipo BAPV5, com uma similaridade de 78% de aminoácidos.

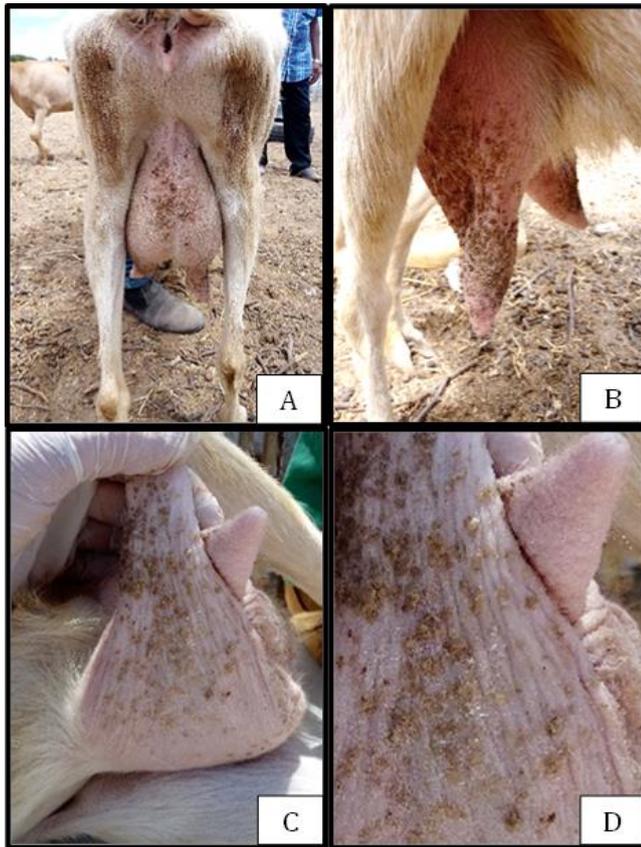
Figura 6 - Macroscopia das lesões do animal 210



Registro macroscópico de lesões papilomatosas do animal 210, indicando a presença de lesões mistas intensas. **Fonte:** Rizzo, H *et al*, 2023, comunicação pessoal.

No caso do animal Baleia (Figura 7), a identificação nos direcionou a um suposto novo tipo de papilomavírus com afinidade ao BPV7, pertencente ao gênero *Dyoxipapillomavirus 1*, com uma similaridade de 72% de aminoácidos.

Figura 7 - Macroscopia das lesões do animal "Baleia"



Registro macroscópico de lesões papilomatosas do animal “Baleia”, indicando lesões predominantemente pedunculadas. **Fonte:** Rizzo, H *et al*, 2023, comunicação pessoal.

Já o animal 212 (Figura 8) apresentou uma coinfeção por BPV5 (100% de similaridade de aminoácidos) e BPV13 (96% de similaridade de aminoácidos).

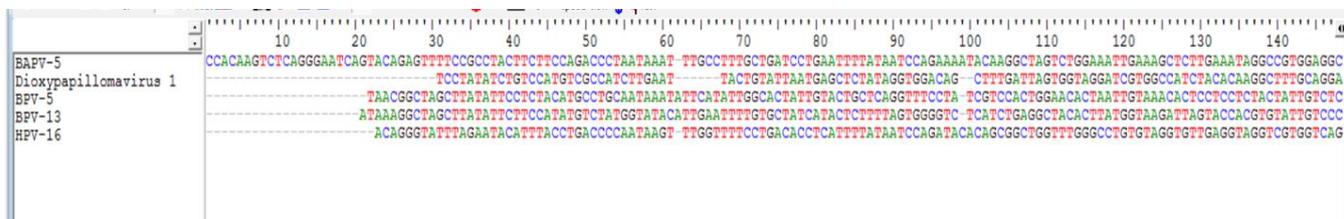
Figura 8 - Macroscopia das lesões do animal 212



Registro macroscópico de lesões papilomatosas do animal 212, demonstrando lesões mistas leves, correspondendo a uma coinfeção BPV5 / BPV13. **Fonte:** Rizzo, H *et al*, 2023, comunicação pessoal.

As sequências de DNA obtidas através das amostras de lesões cutâneas dos caprinos foram submetidas a um processo de alinhamento pelo programa *Bioedit* (Figura 9). Esse procedimento é essencial para visualizar similaridades e diferenças entre os tipos de PVs identificados, especialmente os supostos novos tipos.

Figura 9 - Exemplo de alinhamento das sequências de DNA

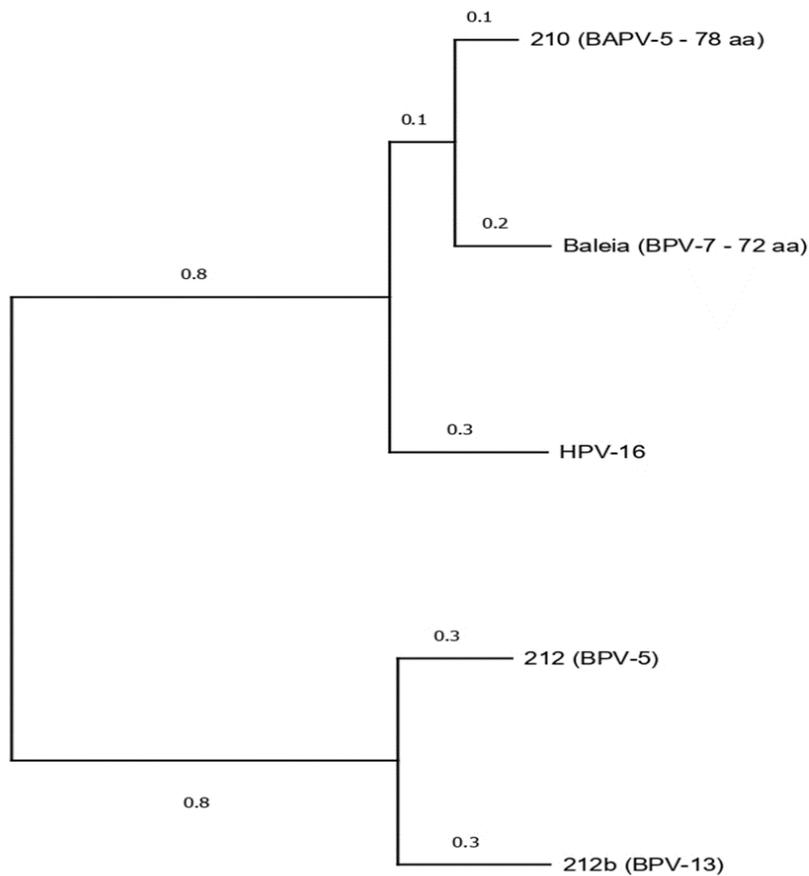


Fonte: Matos, Gabrielly, 2023 (Comunicação pessoal); *Bioedit*

Por meio do alinhamento obtido, que permitiu visualizar a relação entre cada um dos tipos de vírus encontrados, foi gerada a árvore filogenética que

proporciona uma representação gráfica de suas diversidades genéticas, agrupando-os com base em suas similaridades genômicas (Figura 10).

Figura 10 - Árvore filogenética dos tipos e supostos tipos identificados



Filogenia inferida usando o método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) e distâncias evolutivas calculadas utilizando o método de correção de Poisson (Zuckerkandl & Pauling, 1965), relacionando tipos e supostos novos tipos de BPV identificados neste trabalho.

5 DISCUSSÃO

A análise dos resultados revelou uma riqueza surpreendente na diversidade genética dos papilomavírus em caprinos. Entre essas descobertas, destacam-se informações específicas relacionadas a cada animal investigado.

Os dois supostos novos tipos de BPV identificados nos animais 210 e Baleia apresentam características únicas, estabelecendo uma base para novas investigações mais aprofundadas sobre sua origem, caracterização genética, patogenicidade e potencial impacto na saúde desses animais (Munday, 2014).

Considerando o animal 210, cujo suposto novo tipo apresenta similaridades significativas com o BAPV5, indicamos que essa proximidade genética sugere uma constante mudança adaptativa dos PVs, o que implica na necessidade de novos estudos para se entender a evolução desses vírus em diferentes períodos, além de suas implicações clínicas (Van Doorslaer, 2013).

A descoberta do suposto novo tipo no animal Baleia, pertencente ao gênero *Dyoxipapillomavirus*, amplia o espectro da diversidade genética desses vírus. Sua similaridade com o BPV7 sugere uma possível relação filogenética e levanta questões sobre como esses vírus evoluem junto com seus hospedeiros ao longo do tempo (Hatama, 2012; Munday, 2014).

Já a coinfeção identificada no animal 212, compreendendo o BPV5 e BPV13, indica a complexidade das interações entre diferentes variantes virais, uma vez que a sua identificação simultânea sugere a possibilidade de efeitos sinérgicos ou competitivos entre esses tipos específicos, o que pode influenciar as dinâmicas de infecção, a persistência viral, resposta imunológica e manifestações clínicas (Carvalho et al., 2003; Munday, 2014).

A análise filogenética das sequências virais revelou uma relação próxima com outras sequências de BPV previamente identificadas em bovinos. A proximidade genética entre sequências de BPV encontradas em diferentes espécies hospedeiras ressalta a necessidade de investigações mais aprofundadas sobre o potencial de transmissão interespecies desses vírus (Antonsson & Hansson, 2002). Tais descobertas têm implicações importantes para a saúde pública, uma vez que esses vírus podem vir a cruzar barreiras de espécies, apresentando riscos potenciais de zoonose.

Este estudo representa, até onde se tem conhecimento, a primeira descrição de sequências do papilomavírus bovino (BPV) em caprinos, ressaltando-se a novidade e a contribuição significativa deste trabalho para o entendimento da presença deste vírus em uma nova espécie hospedeira.

6 CONCLUSÕES

Em síntese, este estudo ampliou consideravelmente nosso entendimento sobre a diversidade genética dos PVs em caprinos. A identificação de dois supostos novos tipos, especialmente a coinfeção de BPV5 e BPV13 no animal 212, é um indicador da complexidade da ecologia viral nesta nova espécie hospedeira. A dinâmica distinta dessas infecções, como evidenciado pela coexistência de diferentes variantes, sugere implicações clínicas e imunológicas desconhecidas e que merecem atenção.

A constatação de sequências do BPV em caprinos, pela primeira vez registrada neste estudo, é uma contribuição notável para a literatura científica. Essa descoberta inédita ressalta a importância da vigilância contínua e do entendimento abrangente das interações vírus-hospedeiro em diferentes contextos.

A relevância prática dessas descobertas não se limita apenas ao campo da saúde animal, mas também transcende para a saúde pública, considerando a possibilidade de transmissão interespécies desses vírus. Essa perspectiva reforça a importância do paradigma “*One Health*” na abordagem integrada de questões de saúde que afetam humanos e animais.

Dos animais abordados nesse estudo, será ainda necessário realizar a investigação diagnóstica referente a mais quatro indivíduos. Contudo, com base nos resultados já obtidos, evidencia-se a necessidade de expandir essas pesquisas, abrangendo análises mais aprofundadas, tanto do ponto de vista qualitativo como quantitativo. Além disso, a ampliação dos estudos poderia incluir a avaliação de fatores como a influência de variáveis ambientais e genéticas nos padrões de infecção por BPV em caprinos.

REFERÊNCIAS¹

ANTONSSON, A.; HANSSON, B. G. Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. *Journal of virology*, v. 76, n. 24, p. 12537–12542, 2002.

BERNARD, H.-U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, v. 401, n. 1, p. 70–79, 2010.

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.

BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary research*, v. 39, n. 5, p. 45, 2008.

BRIMER, N. et al. Cutaneous papillomavirus E6 oncoproteins associate with MAML1 to repress transactivation and NOTCH signaling. *Oncogene*, v. 31, n. 43, p. 4639–4646, 2012.

CAMPO, M. S. Bovine papillomavirus and cancer. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, v. 154, n. 3, p. 175–188, 1997.

CAMPO, M.S. Bovine papillomavirus: old system, new lessons? In: CAMPO, M.S. (Eds) *Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond*. England: Caister Academic Press, 2006. p.1-34.

CAMPOS, S. R. C. et al. Can established cultured papilloma cells harbor bovine papillomavirus? *Genetics and molecular research: GMR*, v. 7, n. 4, p. 1119–1126, 2008.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

CARR, J.; GYORFI, T. Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. *Clinics in laboratory medicine*, v. 20, n. 2, 2000.

CARVALHO, C. DE et al. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. *Brazilian journal of microbiology*, v. 34, p. 82–84, 2003.

CHAN, S. Y. et al. Genomic diversity and evolution of papillomaviruses in rhesus monkeys. *Journal of virology*, v. 71, n. 7, p. 4938–4943, 1997.

DE VILLIERS, E.-M. et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, v. 32, p. 7–15, 2005.

ERIKSSON, A. et al. 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.

FORSLUND, O. et al. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *The Journal of general virology*, v. 80, n. 9, p. 2437–2443, 1999.

FREITAS, A.C. et al., Papillomavirus DNA detection in non-epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trend in Applied Microbiology**, p. 697-704, 2007.

GHARIZADEH, B. et al. Multiple-primer DNA sequencing method. *Electrophoresis*, v. 24, n. 7–8, p. 1145–1151, 2003.

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.

HAUSEN, H. Z. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, v. 1288, n. 2, p. F55–F78, 1996.

HAUSEN, H. Z. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 92, n. 9, p. 690–698, 2000.

HATAMA, S. Cutaneous papillomatosis in cattle. *Journal of Disaster Research*, n. 7, p. 319-323, 2012.

HOWLEY, P. M., and D. R. Lowy. 2001. Papillomaviruses and their replication, p. 2197-2229. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.

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

LEAL, A. M. et al. Quercetin induces structural chromosomal aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4. *Veterinary and comparative oncology*, v. 1, n. 1, p. 15–21, 2003.

LINDSEY, C. J. et al. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genetics and molecular research: GMR*, v. 8, n. 1, p. 310–318, 2009.

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.

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

MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J. et al. First detection of bovine papillomavirus type 2 in cutaneous wart lesions from ovines. *Transboundary and emerging diseases*, v. 65, n. 4, p. 939–943, 2018.

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.

MUNDAY, J. S. Bovine and Human Papillomaviruses: A Comparative Review. *Veterinary Pathology*, v. 51, n. 6, 2004.

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

NASIR, L.; REID, S. W. J. Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. *Virus research*, v. 61, n. 2, p. 171–175, 1999.

OGAWA, T. et al. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *The Journal of general virology*, v. 85, n. 8, p. 2191–2197, 2004.

OLSON, C. et al. A urinary bladder tumor induced by a bovine cutaneous papilloma agent. *Cancer research*, v. 19, 1959.

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.

ROPERTO, S. et al. Oral fibropapillomatosis and epidermal hyperplasia of the lip in newborn lambs associated with bovine Deltapapillomavirus. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, 2018.

SHAMANIN, V.; DELIUS, H.; DE VILLIERS, E.-M. Development of a broad spectrum PCR assay for papillomaviruses and its application in screening lung cancer biopsies. *The Journal of general virology*, v. 75, n. 5, p. 1149–1156, 1994.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

STOCCO DOS SANTOS, R. C. et al. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *The Journal of general virology*, v. 79, n. 9, p. 2127–2135, 1998.

STOCCO DOS SANTOS, R.C., BEÇAK, W., DINIZ, O., GARCIA, G.S., CARVALHO, C. Papilomavírus infecta 60% do rebanho bovino (2003); <http://www.estadao.com.br>

VAN DOORSLAER, K. Evolution of the papillomaviridae. *Virology*, v. 445, n. 1–2, p. 11–20, 2013.

WOSIACKI, S. R. et al. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *Journal of virological methods*, v. 126, n. 1–2, p. 215–219, 2005.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. Em: BRYSON, V.; VOGEL, H. J. (Eds.). *Evolving Genes and Proteins*. San Diego, CA, USA: Elsevier, 1965. p. 97–166.