



RODRIGO LOPES MEDEIROS

**OCORRÊNCIA DE *PAPILLOMAVÍRUS* EM RÚMEN DE BOVINOS COLETADOS
EM ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS NA REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DE
RONDÔNIA: Coleta de Dados.**

JI-PARANÁ-RO

2020

RODRIGO LOPES MEDEIROS

**OCORRÊNCIA DE *PAPILLOMAVÍRUS* EM RÚMEN DE BOVINOS COLETADOS
EM ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS NA REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DE
RONDÔNIA: Coleta de Dados.**

Monografia apresentada à Banca Examinadora do Centro Universitário São Lucas, como requisito de aprovação para obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Me. Paulo Henrique Gilio Gasparotto

JI-PARANÁ-RO

2020

M488o

Medeiros, Rodrigo Lopes

Ocorrência de *papillomavirus* em rúmen de bovinos coletados em abatedouros frigoríficos na região central do Estado de Rondônia: coleta de dados / Rodrigo Lopes Medeiros. Ji-Paraná: Centro Universitário São Lucas, 2020.

38 p. il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Centro Universitário São Lucas, Curso Bacharelado em Medicina Veterinária, Ji-Paraná, 2020.

Orientador: Prof. Ms. Paulo Henrique Gilio Gasparotto

1. Papilomatose. 2. Verruga. 3. Figueira. 4. Trato Gastrointestinal. I. Gasparotto, Paulo Henrique Gilio. II. Ocorrência de *papillomavirus* em rúmen de bovinos coletados em abatedouros frigoríficos na região central do Estado de Rondônia: coleta de dados. III. Centro Universitário São Lucas.

CDU 636.089

Ficha catalográfica elaborada pelo bibliotecário:
José Fernando S Magalhães - CRB 11/1091

RODRIGO LOPES MEDEIROS

**OCORRÊNCIA DE *PAPILLOMAVÍRUS* EM RÚMEN DE BOVINOS COLETADOS
EM ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS NA REGIÃO CENTRAL DO ESTADO DE
RONDÔNIA: Coleta de Dados.**

Monografia apresentada à Banca Examinadora do Centro
Universitário São Lucas, como requisito de aprovação para
obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária.
Orientador: Prof. Me. Paulo Henrique Gilio Gasparotto

Ji-Paraná, 29 de junho de 2020.

Avaliação/Nota: _____

BANCA EXAMINADORA

Resultado: Aprovado

Centro Universitário São Lucas

Prof. Me. Paulo Henrique Gilio Gasparotto

Centro Universitário São Lucas

Prof. Me. Ana Sabrina Coutinho Marques Rocha

Centro Universitário São Lucas

Prof. Me. João Luiz Barbosa

Centro Universitário São Lucas

RESUMO

O Brasil está entre os maiores produtores de carne do mundo, porém algumas doenças podem prejudicar essa produção acometendo o rebanho e acarretando prejuízos ao produtor. Uma dessas doenças é a papilomatose vulgarmente chamada de verruga ou figueira, é uma doença cosmopolita de caráter infectocontagiosa e origem viral amplamente disseminada no Brasil, o agente etiológico causador da papilomatose bovina é o *Papillomavírus* (PVs), sendo classificado na família *Papillomaviridae*. A maior parte dos PVs são da microbiota da pele, no entanto, em algumas ocasiões, as infecções por alguns tipos do vírus podem apresentar formas clínicas distintas, os papilomas apresentam características nodulares da epiderme podendo ser de forma peduncular ou plana, múltiplas ou únicas, afetando um ou mais animais. Os prejuízos provocados pela papilomatose são diversos, sendo que os nódulos são desconfortáveis para os animais prejudicando a produção de leite e carne, pode manifestar complicações por lesões mecânicas, como hemorragias ou infecções secundárias, cegueira, retardado desenvolvimento, miíases, e se localizados no teto podem provocar mastite devido a não secagem correta na hora da ordenha, a debilitação do animal devido a um grande número de papilomas também podem levar o animal a óbito. Alguns fatores influenciam no surgimento dos papilomas, como carcinomas do trato gastrointestinal superior, que são especialmente causadas por infecção BPV-4 em sinergismo com a ingestão de samambaia. Os animais que estão debilitados são os mais susceptíveis a serem acometidos pela doença, sua transmissão pode ocorrer de forma direta, pelo contato direto do animal infectado com animal hígido ou de forma indireta, por utensílios contaminados, troncos, cochos, cercas, e palpação retal. O diagnóstico da doença se torna fácil em alguns casos por conta da expressão clínica, onde é possível ser observado papilomas a olho nu. Para a realização do trabalho foi realizada uma coleta do banco de dados do laboratório de Virologia da Universidade Federal do Acre e foram analisadas 33 amostras utilizando o software *Action Stat Pro*, coletas de lesões sugestivas de *Papillomavírus* no rúmen, de animais abatidos em abatedouros frigoríficos da região central do estado de Rondônia. Para a identificação do vírus nas amostras foi feito uso da técnica da PCR, indicada para a identificação do *Papillomavírus* devido à alta sensibilidade, especificidade e por não necessitar de cultivo do vírus. A PCR utiliza etapas de oscilação de temperatura que promove a duplicação in vitro das cadeias de DNA. Cada ciclo é reproduzido em torno de 30 a 35 vezes e possibilita a amplificação da região alvo, definida de acordo com o anelamento dos iniciadores sintéticos de DNA. Das amostras analisadas um total de 51,51% das amostras deram positivas para papiloma vírus, podendo com estes resultados e possível evidenciar a ocorrência positiva de *Papillomavírus* de rúmen na região central do estado de Rondônia.

Palavras-chave: Papilomatose. Verruga. Figueira. Trato Gastrointestinal.

ABSTRACT

Brazil is among the largest meat producers in the world, however some diseases can harm this production, affecting the herd and causing losses to the producer. One of these diseases is papillomatosis, commonly called wart or fig, it is a cosmopolitan disease with an infectious and contagious character and widespread viral origin in Brazil, the etiologic agent that causes bovine papillomatosis is Papillomavirus (PVs), being classified in the Papillomavirity family. Most PVs are from the skin's microbiota, however, on some occasions, infections with some types of the virus may have different clinical forms, papillomas have nodular characteristics of the epidermis and can be peduncular or flat, multiple or single, affecting one or more animals. The damages caused by papillomatosis are diverse, and the nodules are uncomfortable for animals, impairing the production of milk and meat, can manifest complications from mechanical injuries, such as bleeding or secondary infections, blindness, delayed development, myiasis, and if located on the roof can cause mastitis due to not drying properly at the time of milking, the debilitation of the animal due to a large number of papillomas can also cause the animal to die. Some factors influence the appearance of papillomas, such as carcinomas of the upper gastrointestinal tract, which are especially caused by BPV-4 infection in synergism with the ingestion of fern. Animals that are weak are the most likely to be affected by the disease, their transmission can occur directly, through direct contact of the infected animal with a healthy animal or indirectly, through contaminated utensils, trunks, troughs, fences, and rectal palpation. The diagnosis of the disease is easy in some cases due to the clinical expression, where it is possible to observe papillomas with the naked eye. To carry out the work, a database was collected from the Virology laboratory of the Federal University of Acre and 33 samples were analyzed using the Action Stat Pro software, collections of lesions suggestive of Papillomavirus in the rumen, of animals slaughtered in slaughterhouses in central region of the state of Rondônia. For the identification of the virus in the samples, the PCR technique was used, indicated for the identification of the Papillomavirus due to its high sensitivity, specificity and because it does not require cultivation of the virus. PCR uses temperature oscillation steps that promote the in vitro duplication of DNA strands. Each cycle is reproduced around 30 to 35 times and allows the amplification of the target region, defined according to the ringing of synthetic DNA primers. Of the analyzed samples, a total of 51.51% of the samples were positive for papillomavirus, and with these results it is possible to show the positive occurrence of rumen papillomavirus in the central region of the state of Rondônia.

Keywords: Papillomatosis. Wart. FIG tree. Gastrointestinal tract.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Proliferação papilomatosa exofítica do epitélio.....	19
Figura 2	Papilomas localizados no rúmen.....	20
Figura 3	Resultado dos testes realizados.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação do <i>Papillomavírus</i> bovino.....	13
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPV- Bovine Papillomavírus (Papillomavírus Bovino)

DNA- Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

PV- Papillomavírus

HPV- Human Papillomavírus (Papillomavírus Humano)

ECR- Early Control Region

NRC- Non-Coding Region

LCR- Late Control Region

ORI- Ponto de Origem

ATP- Adenosina Trifosfato

ORFs- Open Reading Frame

MHC- Major Histocompatibility Complex (Complexo Principal de Histocompatibilidade)

CDKs- Cyclin-Dependent Kinase (Quinase Dependente de Ciclina)

CCE- Carcinoma De Células Escamosas

dNTP's- Desoxinucleotídeos Trifosfato

PBS- Phosphate-Buffered Saline (Salina Tamponada Com Fosfato)

rpm- Rotações Por Minuto

EPI- Equipamento de Proteção Individual

TGI- Trato Gastrointestinal

RIISPOA- Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
1.1	OBJETIVOS.....	10
1.1.1	Objetivo geral.....	10
1.1.2	Objetivos específicos.....	10
1.2	PROBLEMATIZAÇÃO.....	10
1.3	DELIMITAÇÃO DO ESTUDO.....	11
1.4	RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1	ETIOLOGIA.....	12
2.2	CLASSIFICAÇÃO.....	12
2.3	ESTRUTURA GENÔMICA.....	14
2.4	CICLO REPLICATIVO.....	17
2.5	PATOLOGIA.....	19
2.6	SINAIS CLÍNICOS.....	22
2.7	HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA (HEB).....	22
2.8	EPIDEMIOLOGIA.....	23
2.9	TRANSMISSÃO.....	24
2.10	PREJUÍZOS ECONÔMICOS.....	24
2.11	DIAGNÓSTICO.....	25
2.11.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	25
2.11.2	Histopatologia.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1	ÉTICA NA PESQUISA.....	27
3.2	AMOSTRAS.....	28
3.3	EXTRAÇÃO DE DNA E PCR.....	28
3.4	BIOSSEGURANÇA.....	29
3.5	MÉTODO ESTATÍSTICO.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1	RESULTADOS.....	30
4.2	DISCUSSÃO.....	31
5	CONCLUSÃO.....	34
6	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

A pecuária não é só uma atividade de criação, ela também é fonte de renda de muitas famílias brasileiras, não só os produtores dependem da pecuária para sobreviver, mas também os colaboradores responsáveis pelo manejo dos animais, tendo em vista o tamanho do rebanho brasileiro que é constituído por cerca de 210 milhões de bovinos (PRADO, 2017) podemos ver como a pecuária é importante para o sustento dos brasileiros. O Brasil está entre os maiores produtores de carne do mundo, em 2018 estava em segundo lugar em produção de carne bovina, tendo 9,90 milhões de toneladas de equivalente de carcaça, perdendo para os Estados Unidos da América que produziu 12,60 milhões de toneladas (CNABRASIL,2018).

O Brasil também é um grande produtor de leite tornando a pecuária muito importante no país. Porém algumas doenças podem afetar o rebanho e gerar prejuízos ao produtor. Uma dessas doenças é a papilomatose vulgarmente chamada de verruga ou figueira, que é bastante corriqueira nos rebanhos brasileiros. Por ser uma doença comum, diversas vezes ela é subestimada, trazendo muitos prejuízos, que não são levados em conta pelo produtor, se tornando assim um problema ainda maior, os prejuízos econômicos causados pela infecção pelo BPV são significativos a pecuária, sendo ocasionados tanto pela perda direta, quando resulta na morte dos animais, quanto pelas indiretas, provocando uma queda no desempenho dos animais e no valor comercial do gado assim como nos subprodutos (PRADO, 2017).

A papilomatose é uma doença cosmopolita de caráter infectocontagiosa e origem viral amplamente disseminada no Brasil, sendo encontrada em grande parte dos rebanhos, afetando animais de todas as idades e sexo, acometendo tanto rebanhos de corte quanto leiteiro, animais de produção leiteira possuem uma maior predisposição a serem acometidos. Ela é caracterizada por lesões hiperplásicas benignas em tecidos cutâneos e mucosas, podem apresentar formas diferentes. Algumas formas malignas foram associadas ao *Papillomavírus*, assim como a ocorrência da hematúria enzoótica, onde ocorre a expressão da oncoproteína E5 do BPV-2 encontrado na maior parte dos animais acometidos pela doença (ROPERTO et al. 2008).

A identificação de DNA são de suma importância para a realização de um diagnóstico da doença de acordo com Batista (2013) o fator de custo que é consideravelmente elevado para poder sequenciar o genoma completo de vários

BPVs isolados em um estudos populacional. Por conta disto se fazia necessário um método mais barato para a realização de tal feito. O surgimento da reação em cadeia da polimerase proporcionou um avanço considerável para a ciência, pois era capaz de suprir a necessidade e ainda era viável. Sendo uma técnica que se mostrou única, apresentando extrema sensibilidade, facilidade no manuseio, simplicidade e um custo relativamente baixo, se tornando possível ser aplicado em diversas possibilidades (CECCATTO, 2015) a principal vantagem do PCR é de não precisar utilizar tantos passos igual a clonagem, a parte que será amplificada é aquela que se encontra entre os dois *primers*, levando assim à uma alta especificidade (CECCATTO, 2015) Essa especificidade, sensibilidade e rapidez podem resultar em uma praticidade para que ocorra a utilização corriqueira em diversas aplicações (CECCATTO, 2015) A PCR propiciou grandes avanços em diversas áreas do conhecimento. (HAAS; TORRES, 2016) as técnicas moleculares de diagnostico podem ser aplicáveis agora a todas as áreas do laboratório clinico. (CAMARGO; SILVA, 2011)

1.1 OBJETIVOS:

1.1.1 Objetivo geral:

Verificar através de coleta de dados a ocorrência de *Papillomavírus* de rúmen, causador do papiloma das amostras coletadas em abatedouros frigoríficos presente na região central do estado de Rondônia.

1.1.2 Objetivo específico:

Verificar papilomas no rúmen de bovinos

Verificar ocorrência positiva de *Papillomavírus* de rúmen na região central de Rondônia.

1.2 PROBLEMATIZAÇÃO

A papilomatose é uma patologia subestimada, e por ser uma doença auto limitante os produtores não dão à devida importância a seus efeitos, sendo algumas

vezes graves levando esse produtor a ter um grande prejuízo econômico. Existem prováveis prejuízos que a papilomatose pode acarretar ao produtor

A papilomatose é uma doença bastante comum nos rebanhos do Brasil, sendo comumente encontrada nas propriedades com rebanho bovino. Fatores predispõe a ocorrência da papilomatose.

1.3 DELIMITAÇÃO DO ESTUDO

Para a realização deste trabalho foram utilizados dados coletados no laboratório de virologia da Universidade Federal do Acre (UFAC), sendo esses dados proveniente de amostras coletadas em bovinos de ambos os sexos e diversas idades, abatidos nos abatedouros frigoríficos da região central do estado de Rondônia, utilizando amostras que foram comprovadas positivos para *Papillomavírus* por meio da utilização da técnica de PCR.

1.4 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos bovinos do mundo, estando presente grande parte desse rebanho na região amazônica. Por conta da diversidade da região se faz necessário a realização de estudos para obtenção de maior conhecimento da região, visando a exigência em se estudar diversidade genômica dos BPV. Os prejuízos causados pela papilomatose são em diversos casos negligenciado pelo produtor que não tem o conhecimento necessário para entender a gravidade da doença, o que agrava ainda mais o quadro. Por não possuir estudos publicados o suficiente pesquisas apontam que 60% do rebanho do Brasil está acometido por qualquer tipo de *Papillomavírus* (PRADO, 2017).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

O *Papillomavírus* (PVs) é o agente etiológico causador da papilomatose bovina, sendo classificado na família *Papillomaviridae*. Existem poucos estudos sobre a diversidade genética e distribuição do *Papillomavírus* bovino (BPV) no Brasil (DAUDT et al., 2016).

BPVs são um grupo de vírus crescente epiteliotrópicos que identificam o *Bos taurus* como seu hospedeiro clássico, mesmo que ocorra algumas infecções cruzadas bem estabelecidas. Mesmo que os BPVs sejam vírus epiteliotrópicos por infectarem queratinócitos e fibroblastos, podem ser achados nos demais tecidos ou fluídos corporais (MONTEIRO et al., 2008).

A maior parte dos PVs são da microbiota da pele, no entanto, em algumas situações, as infecções por alguns tipos podem apresentar formas clínicas distintas (SILVA et al., 2016). O PV é capaz de se manter ativo por 90 dias a 4 °C e até 180 dias a uma temperatura de - 70 °C. Maior parte dos PVs parece predispor por um ciclo de vida latente, visto que uma extensa variedade de tipos diferentes podem ser detectados em regiões aleatórios de pele saudável de humanos e animais (VILLIERS et al., 2004).

Os PVs são um amplo grupo de vírus que infecta uma extensa variedade de espécies de vertebrados (BATISTA, 2013). Em seres humanos, vírus do papiloma humano (HPVs) estão da mesma forma envolvido com lesões benignas na pele e mucosa (verrugas), bem como do colo do útero, pênis, anal, vaginal e orofaringe. Os PVs são praticamente espécie-específicos e frequentemente sítio-específicos (HARTMANN et al., 2002).

2.2 CLASSIFICAÇÃO

Os papilomas podem ter sua classificação que depende da sua origem, podendo ser viral e não viral, quanto a sua proliferação, dependendo do tecido envolvido na lesão como escamoso (acomete apenas tecido epitelial) ou fibropapilomas (acomete epitélio e mesênquima proliferados). Foi identificado até o

momento mais de 200 tipos de HPV, mas frequentemente são relatadas infecções (DAUDT et al., 2018).

Antes chamada de *Papoviridae* foi dividida em duas famílias, *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae* (BERNARD et al., 2010). A família *Papillomaviridae* é pertencente ao reino: *Shotokuvirae*, sub-reino: *Monodnaviria*, filo: *Cossaviricota*, classe: *Papovaviricetes*, ordem: *Zurhausenvirales*, possuindo duas sub-famílias: *Firstpapillomavirinae* e *Secondpapillomavirinae* (ICTV, 2019) os BPVs são pertencentes a sub-família *Firstpapillomavirinae*, sendo divididos em cinco gêneros: *Deltapapillomavirus*, *Xipapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus*, *Dyoxipapillomavirus*, e *Dyokappapapillomavirus*. Os BPV-19, 21 e 27 não foram classificados em nenhum dos gêneros, mas possivelmente fazem parte de dois gêneros não atribuídos (DAUDT et al., 2018).

Os BPVs que estão classificados no gênero *Deltapapillomavirus* provocam fibropapilomas cutâneos. Os *Deltapapillomavirus* podem, também, causar sarcomas equinos, tumores fibroblásticos não metastáticos e invasivos, câncer de bexiga e esôfago (ARALDI, 2014); os *Xipapillomavirus* responsáveis por provocar lesões de papilomas verdadeiros, principalmente epiteliotrópico; os *Epsilonpapillomavirus* e *Dyokappapapillomavirus* são responsáveis por provocar papilomas verdadeiros e fibropapilomas. Vem sendo relatado infecções pelo BPV em todo o mundo sendo entre eles o BPV-2 um dos tipos mais predominante, o BPV-2 é destinado para espécies do gênero *Deltapapillomavirus* (DAUDT et al., 2016). Conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1-Classificação do *Papillomavírus* bovino

GÊNERO	PAPILLOMAVÍRUS BOVINO
<u><i>Deltapapillomavirus</i></u>	BPV-1, -2, -13 e -14
<u><i>Xipapillomavirus</i></u>	BPV-3, -4, -6, -9, -10, -11, -12, -15, -17, -20, -23,-24 e -26
<u><i>Epsilonpapillomavirus</i></u>	BPV-5, -8 e -25
<u><i>Dyoxipapillomavirus</i></u>	BPV-7
<u><i>Dyokappapapillomavirus</i></u>	BPV-16, -18 e -22
<u>Ainda não classificados</u>	BPV-19, -21 e -27

Fonte: (DAUDT et al., 2018) (DAUDT et al., 2016) (Silva et al., 2015) (SILVA et al., 2016) https://pave.niaid.nih.gov/#explore/reference_genomes/animal_genomes.

2.3 ESTRUTURA GENÔMICA

A família *Papillomaviridae* é conhecida por agrupar vírus não envelopados, com DNA fita dupla circular, constituídos por aproximadamente 8000 pares de bases (pb) (FERNANDES, 2018). Embora possua uma dimensão pequena, a sua biologia molecular é muito complexo (VILLIERS et al., 2004). Possuindo ainda poucos estudos em relação a diversidade genética e distribuição do BPV no Brasil (DAUDT et al., 2016).

O BPV codifica oncoproteínas que estão envolvidas em várias etapas da transformação celular, apresentando ação clastogênica e induzindo a instabilidade genômica que está intimamente ligada à malignidade. O BPV possui um vírion de conformação icosaédrica com um diâmetro de 55-60nm, com 7.265 nucleotídeos (MASUDA, 2010). Os PVs são vírus pequenos e oncogênicos, não envelopados, seu capsídeo é composto por 72 pentâmeros (capsômeros), a proteína L1 e L2 constituem o capsídeo, sendo a L1 a proteína principal e a L2 a proteína secundária interna (TOZATO, 2011).

Seu genoma possui três divisões: a região que codifica as proteínas E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7 que desempenham um papel regulador importante no ciclo de infecção do vírus, chamada de região de controle precoce (ECR – *Early Control Region*); a região que codifica as proteínas L1 e L2 chamada de região de controle tardio (LCR – *Late Control Region*). A região não codificante (NCR – *Non-Coding Region*) de sulfato de heparina, ela é o sítio de ancoragem da proteína L1 (BORZACHIELLO, 2007).

O capsídeo é formado por 360 cópias de proteína L1 e 12 cópias da proteína L2, a proteína L2 é a menor mesmo estando em menor número (BARROS, 2018). As proteínas E equivalem a 45% do genoma e é responsável por codificar as proteínas utilizadas nas fases de transcrição e replicação viral, as proteínas L1 e L2 são geradas nas fases tardias da replicação viral sendo encontradas somente nas células com infecções produtivas. As ORFs-Open reading frame (Quadro de leitura aberto) estão sobrepostas comprimindo vários genes em uma pequena área do genoma (TOZATO, 2011).

A região LCR equivale a 15% do genoma, sendo constituído por elementos reguladores da replicação, da transcrição e pelos promotores que são responsáveis

pelos fatores celulares, contendo também o ponto de origem (ORI) da replicação viral, o LCR não é codificante de proteína (TOZATO, 2011).

E1: Os genes E1 e E2 encontram-se incluídos na regulação da transcrição e na replicação do vírus. Proteína nuclear E1 é codificada pela ORF E1, essa proteína age como helicase dependente do ATP, fornecendo energia para hidrolisar o descondensamento da fita dupla do DNA. Das proteínas do BPV as mais importantes são a E1 e E2. A E1 é a proteína mais conservada, pois possui grande importância no reconhecimento da origem de replicação (ORI), as proteínas E1 e E2 juntas formam o complexo E2-E1-*ori* responsável por auxiliar na construção de um duplo hexâmetro de E1, com atividade de deselcoidização da fita dupla (FERNANDES et al., 2013).

E2: Esta proteína é codificada pela ORF E2, ela é essencial para criar um meio favorável para que ocorra a infecção, está ligada a replicação do DNA e a manutenção do epissomo, transcrição viral e o empacotamento do DNA durante a montagem viral. A proteína E2 tem como função o reconhecimento e ligação à origem de replicação juntamente com o recrutamento da proteína E1 específica na *ori*. A E2 também possui função de ligação ao cromossomo mitótico, com finalidade de proporcionar uma divisão igualada de epissomas virais entre as células filhas (BARROS, 2018).

O PV é capaz de utilizar a proteína E2 para modular a atividade das proteínas E6 e E7, a E2 é imunogênica, sendo assim, ela modula a resposta imune cuja degradação resulta no aumento da expressão das proteínas E6 e E7. Assim o vírus evita a morte celular mantendo a maquinaria necessária para a expressão e replicação do DNA viral ainda em funcionamento (FERNANDES et al., 2013).

E3: Estando presente na minoria dos *Papillomavírus* a ORF E3 ainda permanece com a sua função desconhecida (RIVOIRE et al., 2006).

E4: O gene E4 é totalmente sobreposto em E2, mas é encontrado em uma matriz de leitura diferente. Ele é responsável por produzir uma pequena proteína que se encontra no citoplasma de queratinócitos durante a replicação. A proteína E4 é codificada pela ORF E4 que se encontra dentro da ORF E2, a E4 é altamente abundante nas lesões onde representa 30% do total de proteínas. Ela possui como função ajudar na penetração do vírus nas células basais, estando juntamente relacionada com distúrbio na integridade da queratina, sendo responsável pelo efeito citopático (BARROS, 2018).

E5: Na infecção pelo BPV-5 o principal gene identificado em células transformadas é o gene E5. Esse gene é extremamente conservado nos PVs causadores de fibropapilomas (TOZATO, 2011).

A oncoproteína E5 é um polipeptídeo hidrofóbico de transmembrana com função oncogênica. Ela é codificado pela ORF E5, se expressando na camada basal do epitélio acometido encontrando-se na membrana do retículo endoplasmático e complexo de Golgi, onde vai promover a alcalinização da membrana, tendo como resultado o sequestro das moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe I e II (MHC-I e II) impedindo que o MHC atinja a superfície da célula (BORZACCHIELLO, 2007).

Desempenha o papel de desorganizar o controle do crescimento da celular, interferindo na comunicação mediada pelas junções gap, bloqueando a conexina tornando a célula insensíveis aos controles de crescimento das células normais adjacentes. Atuar regulando negativamente a expressão das proteínas supressoras tumorais p21 e p27 é outra função da E5 (BARROS, 2018).

E6: A proteína E 6 é codificada pela ORF E6, sendo responsável pela modificação do citoesqueleto de actina, pela degradação proteossômica via ubiquinização (degradação proteossômica mediada pela adição de monômeros de ubiquitina) da p53, após se formar o complexo E6-ubiquitina ligase, bloqueando assim o sinal da via de apoptose, a E6 inibe a função da p53, pois na presença dessa proteína quando tem algum dano no DNA ela interrompe o ciclo celular, assim quando a E6 inibe a proteína p53 ela mantém o ciclo celular permitindo que ocorra a amplificação do genoma viral. A proteína supressora tumoral p53 é codificada pelo gene TP53, que possui capacidade de regular a transcrição da p21, um importante inibidor de quinase dependente de ciclinas (BORZACCHIELLO, 2007).

E7: A E 7 também conhecida como UBR4, é codificada pela ORF E7, essa oncoproteína é responsável por degradar a proteína imunossupressora tumoral pRb (proteínas do Retinoblastoma) e interage com as CDKs p21Waf1/cip1 e p27kip1, resultando em transformação maligna. A E7 está ligada a hiperplasia das células da camada espinhosa, levando a uma elevação no número de desmossomos e tonofibrilas (ARALDI, 2014).

E6 e E7 são oncoproteínas que provocam anormalidades centroméricas, aumentando o risco de segregação errada do cromossomo e aneuploidias, estimulando juntamente a replicação excessiva do DNA, isso predispõe a quebras do

DNA levando a instabilidade genômica. Essa instabilidade genômica é visualizada por perda e ganho cromossômico, sendo comumente observado em tumores sólidos, tratando-se do primeiro passo que leva a transformação celular (ARALDI, 2014).

As proteínas E5, E6 e E7 são proteínas precoces necessárias no processo carcinogênico do BPV, sendo chamadas de oncoproteínas (BARROS, 2018).

L1: O gene L1 mostra a região do genoma viral mais conservada, sendo muito importante para classificar os tipos, subtipos e variantes dos PV (VILLIERS et al., 2004). A proteína L1 possui a NCR- como sitio de ancoragem o que resulta na endocitose viral (FERNANDES et al., 2013).

L2: A proteína L2 se liga ao DNA durante a morfogênese do vírion. As proteínas L1 e provavelmente a L2 podem interceder a ligação do vírus com o receptor de membrana celular durante a infecção (FERNANDES et al., 2013).

2.4 CICLO REPLICATIVO

O ciclo replicativo do BPV está profundamente relacionado ao programa de diferenciação do tecido epitelial dos hospedeiro. É considerado provável que os *Papillomavírus* partilhem do mesmo procedimentos durante o ciclo de vida produtiva, mesmo que possuam diferentes potenciais oncogênicos. As células epiteliais basais são infectadas preferencialmente, pois são expostas resultante de micro lesões do epitélio (TOZATO, 2011).

Após o vírus invadir a célula os vírions vão migrar para o núcleo. A replicação genômica acontece na fase S do ciclo celular decorrente da ação das proteínas E1 e E2, agindo em conjunto com as proteínas de replicação celular (LEE e LAIMINS, 2007). Depois da replicação do genoma as células infectadas se diferenciam permanecendo com o ciclo celular ativo, onde em circunstâncias normais ocorreria a diferenciação e elas interromperiam o ciclo replicativo celular após deixar a camada basal. Com as células mantendo ciclo replicativo ativo, isso permite com que elas voltem a entrar na fase S, mantendo o alto nível de replicação viral. Essa possibilidade da célula de manter o ciclo replicativo ativo se dá por conta da ação realizada pela proteína viral E7. As Proteínas virais do capsídeo L1 e L2 são codificadas nas transcrições tardias. A progênie dos vírions é construída nas células altamente diferenciadas sendo liberadas para o meio extracelular em seguida ocorrendo a

síntese das proteínas L1 e L2 do capsídeo na camada granular do epitélio (LEE e LAIMINS, 2007).

Para ocorrer a infecção pelo BPV é necessário a presença de uma pequena lesão tecidual, na qual exponha os peptídeo-glicanos de sulfato de heparina que constituem a membrana plasmática (ARALDI, 2014). Assim a proteína L1 do BPV se liga ao sulfato de heparina resultando em uma mudança conformacional que expõe a proteína L2 que é clivada pela Furina levando a uma segunda alteração na estrutura. O que permite a ligação do vírus a integrina $\alpha 6$ de forma que as partículas virais entrem na célula por meio de endocitose mediada por clatrina e caveolina (FERNANDES et al., 2013).

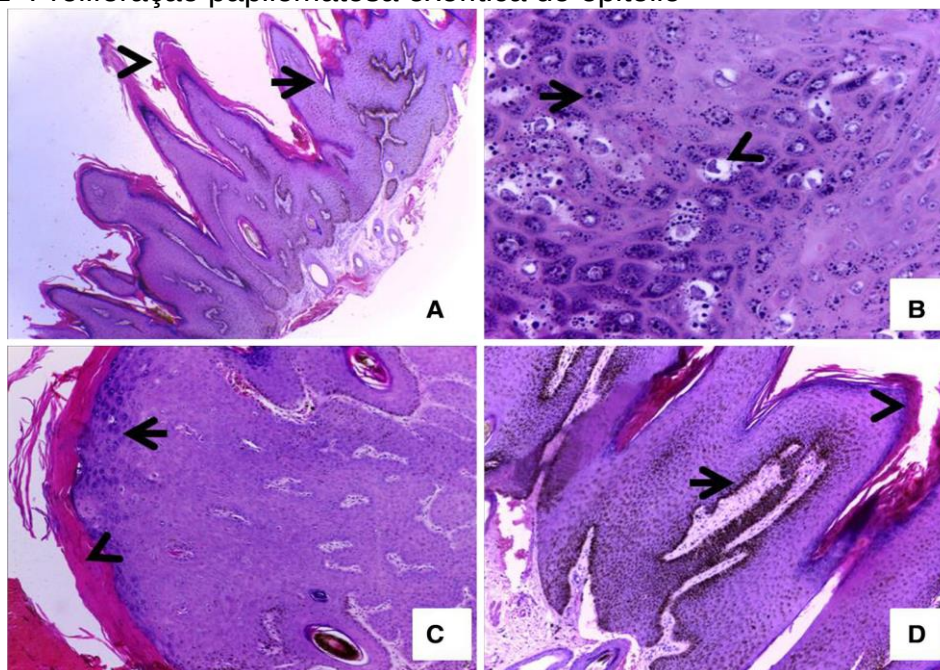
A infecção produtiva é quando ocorre a expressão gênica dos BPVs sendo conectados a diferentes etapas de diferenciação celular de queratinócitos e só ocorrendo com aqueles que sofreram diferenciação terminal. O vírus infecta células basais expressando alguns de seus genes, replicando seu genoma nos estratos escamosos e granulares, quando expressa seus genes estruturais formados nos ceratinócitos escamosos, os novos vírus são liberados na camada córnea (MASUDA, 2010).

O gene E4 é responsável por codificar pequenas proteínas que estão em alta concentração no citoplasma dos ceratinócitos, que vão interagir com os filamentos de citoceratina. Os genes E1 e E2 são genes precoces sendo encarregados pela replicação do DNA assim como pelo controle da transcrição (BARROS, 2018).

As ORF's E5, E6 e E7 estão envolvidas no processo de sobrepor o controle do ciclo celular participando do processo de transformação celular em célula hospedeira. Os *Papillomavírus* bovino-3, -4 e -6 não possuem a ORF E6 sendo substituída pela E5 nesses vírus (MASUDA, 2010).

O gene E6 é indispensável nos BPV-1 e *Papillomavírus* humano (HPV) ele provoca a imortalização da célula degradando o gene supressor tumoral, inibindo a regulação do ciclo celular e a apoptose (MASUDA, 2010). Na histologia pode ser visualizado as alterações sofridas pelo tecido acometido, conforme apresentado na figura 1.

Figura 1- Proliferação papilomatosa exofítica do epitélio



Fonte: (SILVA et al., 2015)

Nota: (a) Acanthose (flecha) e hiperqueratose ortoqueratótica moderada (ponta de flecha). Obj.10x. (b) Deposição aumentada de grânulos de querato-hialina (flecha) no estrato granuloso e em alguns coilocitos (ponta de flecha). Obj.40x. (c) Grânulos de querato-hialina (seta). Hiperqueratose ortoqueratótica (ponta de flecha). Obj.10x. (d) Retenção acentuada de melanina no estrato basal da epiderme (flecha) hiperqueratose discreta ortoqueratótica (ponta de flecha). Obj.10x

2.5 PATOLOGIA

A papilomatose é uma doença infectocontagiosa, tendo o *Papillomavírus* como agente etiológico. É conhecida também como “figueira”, “verruca”, “fibropapilomatose” e “epitelioma contagioso”, ela é classificada como uma doença cosmopolita e está intimamente associada à imunidade celular animal (FERREIRA et al., 2017).

A papilomatose pode ser descrita como uma hiperplasia do epitélio de revestimento, com alongamento ou alargamento das cristas interpapilares que se projetam acima da mucosa de superfície (MONTEIRO et al., 2008). A espécie com maior ocorrência é a bovina, que pode apresentar infecção cutânea, urogenital e orofaríngea (GONÇALVES et al., 2019).

A papilomatose se manifesta nos animais através da presença de nodulação em diferentes regiões do corpo, podendo ser internos como em sistema digestório e bexiga, também externo como pele, pescoço, regiões de cabeça, em torno dos olhos e boca, úbere podendo se espalhar para o resto do corpo. Pode ocorrer com que os

animais desenvolvam extensos papilomas no trato gastroentérico superior, e venham à apresentar como consequência, dificuldades para se alimentar e respirar, deixando-os debilitados podendo assim vir a óbito (MONTEIRO et al., 2008).

Os papilomas apresentam características nodulares da epiderme podendo ser de forma peduncular ou plana, múltiplas ou únicas e afetando um ou mais animais. O papiloma de forma pedunculado é mais comum de ocorrer em animais jovens, se caracteriza por apresentar formato que se assemelha a de couve flor, possuindo coloração escura, superfície irregular e consistência dura. O papiloma de forma plana é mais comum em animais velhos, é caracteriza por apresentar forma circular, não apresenta relevo muito elevado e podendo ter coloração clara ou escura. Os papilomas normalmente surgem na cabeça, pescoço e cernelha, ocasionalmente no dorso e abdome, podendo ter duração de um ano ou mais (HARTMANN et al., 2002). Na figura 2 pode ser visualizado papilomas presente em região ruminal de bovinos.

Figura 2- Papilomas localizados no rúmen



Fonte: (GASPAROTTO, 2019)

Nota: Papilomas encontrados em região ruminal apresentando forma peduncular de superfície lisa e múltiplos.

A ocorrência da papilomatose é um indicativo de baixa resposta imunológica dos animais. Uma predisposição são os animais que não recebem suplementação alimentar, podendo provocar nos bovinos uma diminuição na imunidade favorecendo dessa forma a ocorrência de enfermidades como a papilomatose (MARINS, 2004).

A papilomatose é uma doença de distribuição mundial, não possui relato de predileção por raça ou sexo. Essa enfermidade possui uma baixa letalidade, e quando resulta na morte do animal é devido a ocorrência de miíases, que ocorrem quando os papilomas são lesionados ou arrancados de forma traumática. Animais jovens possui uma maior predisposição, tem sido observado com mais frequência em animais com idade inferior à os dois anos e de preferência estabulados (SILVA et al., 2004).

Os papilomas são excessivamente desconfortável para os animais afetando a produção de leite e carne, levando a o surgimento de uma infecções bacterianas secundárias e miíases (FERREIRA et al., 2017). A debilitação do animal devido a um grande número de papilomas também podem levar o animal a óbito. A papilomatose pode manifestar complicações por lesões mecânicas como hemorragias ou infecções secundárias, que podem ocorrer nos papilomas grandes ou nos aglomerados podendo levar a transtornos gerais tóxicos e até a septicemia (SANTIN; BRITO, 2004). Podem ocasionar cegueira, retardado desenvolvimento, miíases, produtividade reduzida, e se localizados no teto podem provocar mastite devido a não secagem correta na hora da ordenha (RECH et al., 2018).

Animais imunossuprimidos costumam permanecer por um tempo maior com a doença, na maioria dos casos a papilomatose possui regressão espontânea, ou seja, ela possui característica autolimitante, onde mesmo sem a aplicação de um tratamento ela apresenta desaparecimento das lesões. O papiloma pode estimular a imunidade humoral e cito-mediada desencadeando assim a cura espontânea da doença (SILVA et al., 2004). Porém algumas situações são de complexa resolução, a multiplicação de animais acometidos no rebanho favorece a propagação do agente contaminando outros animais (SILVA et al., 2017). O próprio animal acometido pela doença se torna reservatório durante o curso da patologia que é geralmente longo. O período de incubação e a manifestação das lesões variam de semanas a meses (RECH et al., 2018).

2.6 SINAIS CLÍNICOS

Os papilomas são lesões de aspecto nodular, resultado de infecção por *Papillomavírus*, podendo possuir coloração que varia de branco-acinzentado a negra, de consistência dura, normalmente apresenta superfície áspera e friável. Além de apresentar uma aparência mais desagradável no animal atingido pela papilomatose ela também causa incômodo no animal, provocando a exibição de alguns sinais clínicos, dentre eles o desenvolvimento retardado, cegueira, Infecções secundárias resultando em mastites, queda na produção de leite, lesões papilomatosas no úbere, lesões nos tetos, pênis, papadas, costas, fibropapilomas cutâneas, gastrointestinais, verrugas ao redor dos olhos e úbere da orelha, e tumores de bexiga (BARROS, 2018).

Alguns dos BPV são correlacionado à neoplasias nos bovinos principalmente quando associados com cofatores ambientais, como a ingestão de samambaia que predispõe a o câncer da bexiga urinária. O PV também provoca papilomas no trato gastrointestinal superior que pode evoluir para carcinomas (HAGA et al., 2013).

Quando os nódulos se apresentam no esôfago e/ou rúmen o animal pode apresentar sinais clínicos direcionados a regurgitação e timpanismo. Animais com tumores ulcerados nesta área apresentava halitose acentuada devido à impactação de alimentos e necrose da massa tumoral (SOUTO et al., 2006).

As causas menos comuns do timpanismo obstrutivo são os carcinomas, lesões granulomatosas ocasionadas pelo *Actinomyces bovis* perto da goteira esofágica e na parede do retículo assim como papiloma da goteira esofágica e retículo (PATRÍCIO, 2012). Papilomas no sistema digestório podem ser achados acidentais de necropsia ou frigorífico, podem vir acompanhados de carcinoma de células escamosas (CCE) causado pela consumo crônica de *Pteridium arachnoideum* (REIS et al., 2017). Os tumores normalmente apresentam regressão espontânea, no entanto, podem permanecer e na presença de cofatores ambientais e/ou genéticos podendo evoluir para um câncer. Em casos mais graves a papilomatose pode ocasionar a morte do animal (BARROS, 2018).

2.7 SAMAMBAIA DO CAMPO

A *Pteridium aquilinum* v. *arachnoideum* é classificada na família *Polypodiaceae*, ela é mais conhecida como samambaia do campo. Juntamente com

BPVs (BPV-1, BPV-2, e BPV-4), o consumo de samambaia (*Pteridium aquilinum*) é ligada com diversos tipos de tumores na bexiga e no trato alimentar (TESSELE; BARROS, 2016).

É uma planta fácil de ser encontrada em quase todo o Brasil, sendo mais encontradas em solo pouco fértil, arenoso e ácido. Ela é uma planta toxica de ampla distribuição. Os carcinomas do trato gastrointestinal superior são especialmente causadas por infecção BPV-4 em sinergismo com a samambaia. As concentrações de substâncias tóxicas mudam dependendo dos estágios de crescimento da planta, encontrando-se mais tóxica na fase de brotação (GARSZARECK, 2010).

A samambaia é bastante conhecida por seus efeitos carcinogênicos, mutagênicos e imunossupressores, possui a Ptaquilosídeo que tem como principais causas os tumores intestinais, bexiga e os mamários, a quercentina que apresenta efeito radiomimético e imunossupressor, seu efeito imunossupressor limita a eficácia da resposta imune do animal diante do agente etiológico. O surgimento de tumores se deve provavelmente pela ação do Ptaquilosídeo (GARSZARECK, 2010).

2.8 EPIDEMIOLOGIA

A papilomatose bovina é bastante comum no Brasil acometendo preferencialmente bovinos com idade inferior a dois anos, mas bovinos de diversas idades podem ser acometidos, tendo uma maior ocorrência em propriedades onde os animais se apresentam mais aglomerados como em confinamentos ou rebanhos de leite. Para que ocorra a infecção pelo vírus é necessário que tenha uma lesão como porta de entrada do vírus no epitélio (ARALDI, 2014).

Além de causar infecções no hospedeiro original (bovino) o *Papillomavírus* foi detectado em lesões de outras espécies como os equinos e búfalos (DAUDT et al., 2016). Os PVs infectam epitélio e mucosas sendo em muitas vezes áreas específicas do corpo (VILLIERS et al., 2004). A papilomatose é bastante comum, mas em áreas que apresentam alta infestação por samambaia a papilomatose apresenta persistência em elevadas quantidades no trato alimentar (MASUDA, 2010). A papilomatose cutânea que acomete o rebanho leiteiro possui predileção por regiões específicas, podendo acometer o animal por longos períodos. (VILLIERS et al., 2004).

O processo de infecção do vírus é ligado a replicação do genoma viral, esse processo necessita dos fatores do hospedeiro, esses fatores podem ser inibidos ou

ativados pelas proteínas do patógenos durante a infecção. Alguns estudos demonstram que o vírus possui a capacidade de regular esses fatores para proporcionar um alto número de cópias do genoma viral desencadeando assim o processo infeccioso (BARROS, 2018).

2.9 TRANSMISSÃO

Os animais que estão debilitados são os mais susceptíveis, sua transmissão pode ocorrer de forma direta, pelo contato direto do animal infectado com animal hígido ou de forma indireta, por utensílios contaminados, troncos, cochos, cercas, e palpação retal. Depois de invadirem a pele os PVs infectam as células basais da epiderme induzindo de forma expressiva a mitose das mesmas ocasionando acantose e hiperqueratose (SILVA et al., 2017).

Muitos fatos ainda não foram respondidos, em especial o que abrange suas vias de infecção e o motivo de alguns tipos induzirem mutações cancerosas enquanto outros restringem-se à tumores benignos (FERNANDES, 2018). Por se tratar de uma doença transmitida preferivelmente por contato físico, ordenha e/ou amamentação as áreas mais acometidas pelas lesões são a cabeça, vulva, úbere e tetos (FERNANDES, 2018).

Quando os animais apresentam verrugas genitais aumentam as chances da transmissão ocorrer de forma sexual, o contágio pela inseminação é considerado raro. Na ordenha manual ou com equipamento de ordenha pode ocorrer infecção do animal que pode vir a manifestar a forma mamaria da doença. A infecção transuterina com o *Papillomavírus* Bovino - BPV pode acontecer ao longo da gestação o que justifica a verruga congênita (MARINS, 2004).

2.10 PREJUÍZOS ECONÔMICOS

A papilomatose cutânea bovina provoca consideráveis perdas sendo amplamente distribuída nos rebanhos brasileiros, causa grandes prejuízos com infecções secundárias e gastos utilizados com tratamentos, por ser várias vezes negligenciada por produtores e profissionais a Papilomatose acarreta em grandes prejuízos econômicos a pecuária. Os prejuízos econômicos decorrentes da papilomatose bovina são a desvalorização do couro e a diminuição da produtividade

(SILVA et al., 2004). Ocorrendo assim uma sutil depreciação no valor do animal por conta da dificuldade no comércio do mesmo, de dificuldades relacionados com a fertilidade especialmente quando o papiloma está localizado na genitália (GONÇALVES et al., 2019).

Animais que apresentam papilomas na base da língua, faringe e epiglote, apresentam dificuldade na deglutição do alimento sofrendo perda de desempenho e, quando acomete a região mamária torna mais complexa a colocação da ordenha mecânica, desvalorizando ao mesmo tempo os animais e dificuldade em amamentar o bezerro (TOZATO, 2011). Essa dificuldade na ordenha pode ter como resultado os quadros de mastite e obstruções de tetos sendo observado principalmente em fêmeas primíparas. Quando os papilomas acometem regiões mais específicas como prepúcio, testículos e pênis (nos machos), tetas e úbere (nas fêmeas) tornando assim insatisfatório seu desempenho zootécnico podendo acarretar em grandes prejuízos (HARTMANN et al., 2002).

Levando em consideração o ponto de vista sanitário, o rebanho leiteiro são mais susceptíveis a doenças infectocontagiosas podendo comprometer de forma considerável a saúde do animal e a produção leiteira resultando em prejuízos ao produtor (TOZATO, 2011).

2.11 DIAGNÓSTICO

2.11.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O diagnóstico da doença se torna fácil em alguns casos por conta da expressão clínica, onde é possível ser observado papilomas a olho nu. Em alguns casos pode-se dispor de alguns testes para auxiliar no diagnóstico, esses testes revelam algumas alterações celulares que podem indicar uma possível infecção pelo vírus. Os testes utilizados para detectar ácido nucleico viral são mais sensíveis, além de detectar a infecção podem também determinar o tipo de vírus que está envolvido. Uma destas técnicas utilizadas é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), uma técnica de amplificação utilizada para sintetizar sequências específicas de DNA *in vitro*. A técnica da PCR adequa-se para a identificação do *Papillomavírus* por conta da alta sensibilidade e especificidade e por não necessitar o cultivo do vírus (MONTEIRO et al., 2008).

A PCR utiliza etapas de oscilação de temperatura que promove a duplicação in vitro das cadeias de DNA. Cada ciclo é reproduzido em torno de 30 a 35 vezes e possibilita a amplificação da região alvo definida de acordo com o anelamento dos iniciadores sintéticos de DNA (CAMARGO; SILVA, 2011), a cada ciclo a quantia de fragmentos de DNA na reação dobra (HAAS; TORRES, 2016).

Nesse processo se faz necessário a utilização dos quatro nucleotídeos do DNA, os desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP's) que são as bases nitrogenadas, elas são o molde de DNA, os primers ou sequencias iniciadoras, e uma DNA polimerase termoestável. Por ser uma enzima termoestável, a *Taq* DNA polimerase possibilita a execução de múltiplos ciclos de reação com uma única adição de enzima, o que permitiu a automatização da reação e consequentemente a generalização de seu uso (HAAS; TORRES, 2016), tornando assim possível a partir de uma fita molde a obtenção de diversas copias de uma sequência de ácido nucleico específica. A identificação por PCR pode ser comprometida por alguns elementos primários, como concentração de DNA e a sua purificação (DAUDT et al., 2018).

A PCR se constitui de três etapas básicas por ciclo de oscilação de temperatura: I) a desnaturação da fita molde de DNA, esta etapa pode durar de 30 segundos a 1 minuto com uma temperatura de 92 a 96 °C; II) iniciadores sintéticos da reação de polimerização, onde se ligam a o campo complementar da fita de DNA que será duplicada, esta etapa pode ter duração de 30 segundos a 1 minuto com uma variação de temperatura de 58 a 65 °C; III), à amplificação por meio da *taq* polimerase enzima responsável por amplificar o DNA a partir de iniciadores utilizando as bases nitrogenadas como substrato da reação, esta etapa pode ter duração de 45 segundos a 1 minutos a uma temperatura de 72 °C. A *Taq* polimerase utilizada é a polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*, que possui como ambiente águas quentes de gêiseres e vulcões submersos, possuindo um ponto ideal de crescimento entre 70 e 75°C (CECCATTO, 2015).

2.11.2 Histopatologia

A hiperplasia do epitélio pavimentoso estratificado é bastante destacada, sendo possível que se estenda até a derme, o estrato espinhoso é a camada mais grossa da epiderme ocorrendo normalmente o desaparecimento das pontes intercelulares. A sustentação da hiperplasia é feita por uma haste fibrovascular

(FERNANDES et al., 2009). Os papilomas escamosos provocados por vírus devem ser diferenciados dos que possui causa não-viral mesmo que tenham diversas características clínicas e histopatológicas em comum. Utilizando de microscopia eletrônica é possível a visualização da estrutura hexagonal densa do vírus no núcleo das células do estrato granuloso e estrato córneo (FERNANDES et al., 2009). Com a utilização da microscopia eletrônica pode ser observado o efeito citopático viral nas células podendo ser visualizado de duas maneiras: A primeira compreende na visualização de ceratinócitos apoptóticos. A segunda sendo a mais importante, apresenta coilócitos, que são ceratinócitos (escamosos ou granuloso) apresentando núcleo picnótico, excêntrico, possuindo um marcado halo perinuclear. Na histologia as neoplasias se consistem em várias projeções papilares de espessura variada, encobertas por epitélio escamoso estratificado acantótico uma grossa camada córnea ortoceratótica (TESSELE; BARROS, 2016).

Histologicamente a papilomatose causada pelo *Papillomavírus* tem seu desenvolvimento dividido em três fases: o crescimento que é diferenciado por apresentar hiperplasia das células basais, acantose leve a moderada, hiperkeratose, parakeratose e uma quantidade reduzida de corpúsculos de inclusão; O desenvolvimento é uma fase com elevada acantose, apresentando tumefação celular e acentuada hiperkeratose ortoceratótica e parakeratótica, é nessa fase que é possível ser observado vários corpúsculos de inclusão viral intranucleares podendo ser visualizados em células tumefeitas ou degeneradas das camadas espinhosa e granular; a fase de regressão dos papilomas é diferenciada por apresentar leve hiperplasia epidermal, um aumento na formação de redes, discreta proliferação de fibroblastos, deposição de colágeno e infiltrado de linfócitos T na interface dermo-epidérmica. Mesmo depois da regressão, formas episomais de DNA de BPV podem ser observadas em linfócitos circulares, sugerindo que fatores imunossupressivos ou citocinas são capazes de reativar a latência viral e provocar lesões (MASUDA, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÉTICA NA PESQUISA

O trabalho se trata de uma coleta do banco de dados do laboratório de virologia da Universidade Federal do Acre e, foram analisadas 33 amostras

provenientes de lesões ruminais. É dispensada a aprovação na comissão de ética no uso de animais por se tratar de animais abatidos em abatedouros frigoríficos registrados em algum tipo de inspeção sanitária e por se tratar de coleta de dados.

3.2 AMOSTRAS

As amostras foram provenientes de diferentes municípios do estado de Rondônia, região norte do Brasil. As lesões sugestivas de papilomatose no rúmen foram coletadas em abatedouro frigorífico sob serviço de inspeção Federal, na região central do estado de Rondônia. A coleta foi realizada utilizando pinças e lâminas de bisturi estéreis para cada lesão. Posteriormente, parte de cada amostra foi acondicionada em formol a 10% e a outra refrigerada a uma temperatura de 4°C.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA E PCR

As amostras de papiloma foram trituradas com areia estéril em 10 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,4), e centrifugadas por 2000 rpm durante 10 minutos (HATAMA *et al.*, 2008). Alíquotas foram utilizadas para a extração do DNA, foi realizado por um protocolo que utiliza sílica (BOOM *et al.*, 1990), onde o DNA foi purificado em uma reação contendo sílica e um tampão de lise com tiocianato de guanidina. Após a lise, o complexo sílica-ácido nucléico foi lavado duas vezes com um tampão contendo tiocianato de guanidina, duas vezes com etanol 75% e uma vez com acetato. O complexo foi seco, e diluído em TE (10 mM Tris HCl pH 8,0 e 1mM EDTA) e centrifugado, sendo o produto final estocado a - 20°C.

Para a amplificação parcial do gene L1 dos PV, foram utilizados os *primers* degenerados FAP59 e FAP64, resultando em um produto de amplificação com 478 pares de base (pb) (FORSLUND *et al.* 1999). A reação foi realizada com 2,5 µL do DNA extraído, 0,4 pmol/ml de cada iniciador; 2,5 unidades de Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, EUA), 1x PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM de cada dNTP e água ultrapura estéril para o volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa de 10 min a 94°C, seguida de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C e uma etapa final de 7 min a 72°C. Alíquotas de 5 µL dos produtos amplificados foram

submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% corante Blue Green I (LGC, Brasil), utilizando 0,1 µL/mL por amostra. O gel foi visualizado sob luz UV.

Os produtos da PCR foram purificados utilizando os kits comerciais NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel e, posteriormente, sequenciados utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems), com os iniciadores direto e reverso. A qualidade das sequências obtidas foi avaliada pelos softwares Phred/Phrap Consed Analysis Program (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) e a identidade dos produtos foi comparada com as sequências depositadas em bases públicas de dados (GenBank – National Institute of Health, Bethesda, MD, EUA) utilizando o software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para a definição de subtipos e variantes de PV, foi utilizado o critério do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, 2019).

3.4 BIOSSEGURANÇA

Toda a manipulação das amostras no frigorífico e no laboratório, bem como a manipulação dos reagentes e produtos químicos empregados para a elaboração das técnicas laboratoriais, foram realizadas utilizando dispositivos de biossegurança disponíveis no laboratório de virologia geral e parasitologia ou em laboratório de apoio. Desta forma, os procedimentos e EPIs utilizados foram: luvas de manipulação descartáveis; máscaras descartáveis; aventais específicos para cada tipo de manipulação; pipetadores automáticos; ponteiras com proteção para aerossóis; material plástico descartável; ambientes distintos para a elaboração de diferentes etapas da pesquisa (1- processamento do material bruto; 2- extração de ácido nucleico; 3- elaboração do MIX-PCR; 4- realização da técnica de PCR; 5- análise dos produtos amplificados); utilização de substâncias neutralizadoras de produtos tóxicos tais como isotiocianato de guanidina; descarte adequado do material biológico e produtos tóxicos e esterilização de todos produtos potencialmente infecciosos.

3.5 MÉTODO ESTATÍSTICO

O método estatístico utilizado foi o teste de proporção, no qual foi feito utilizando o software *Action Stat Pro*, sendo assim realizado o teste de proporção,

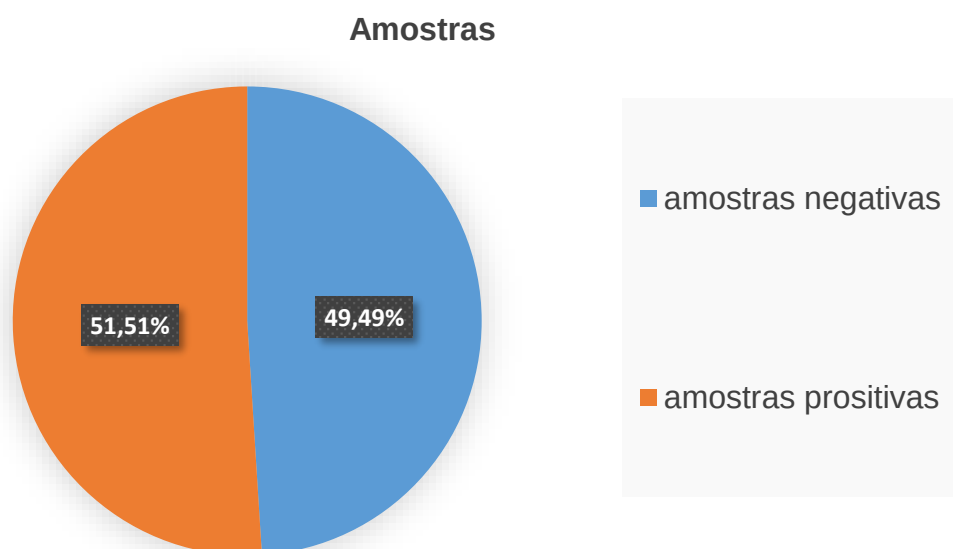
utilizando o tipo de cálculo para Tamanho Amostral e *Poder*, em ambos os testes o nível de significância utilizado foi 0,05 se equivalendo a 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS

Das 33 amostras analisadas, 17 foram positivas para *Papillomavírus* e 16 negativos, conforme ilustrado na figura 3. Isso resulta em um percentual de 51,51% das amostras positivas e 48,49% negativas.

Figura 3- Resultado dos testes realizados



Fonte: (MEDEIROS, 2020)

Utilizando o método estatístico para Tamanho Amostral foi possível chegar à seguinte conclusão, com os resultados obtidos neste teste é demonstrado que o tamanho amostral necessário para que o teste identifique uma diferença entre as proporções nula de $p_0 = 0,51$, e uma possível proporção real $p = 0,49$, sendo o poder de no mínimo 0,51, o tamanho da amostra (n) precisa ser = 1743 elementos. Quando feito o cálculo para *Poder* obtivemos a seguinte conclusão, com os resultados obtidos foi possível observar que este teste tem poder de, aproximadamente 7,85% em identificar uma diferença entre a proporção de hipótese nula $p_0 = 0,51$ e uma possível proporção real $p = 0,49$.

4.2 DISCUSSÃO

Como Silva et al. (2015) afirmam que à Amazônia é uma área propícia para descobertas de novas cepas, sendo encontrado nesta região um dos maiores rebanhos de bovinos de corte do Brasil. Concordando com esta necessidade de estudo envolvendo a região amazônica, Silva et al. (2015) relata ainda que, utilizando amostras oriundas do estado de Rondônia foi identificado 4 estirpes (01RO10, 02RO10, 12RO12, 17RO12) classificadas como novos subtipos putativos de BPV13, 2 estirpes homólogas, identificou como 09RO11 e 14RO12, representantes de um novo tipo putativo. Pode com isso proporcionar um grande avanço nos estudos dos PVs com realização de estudos na região amazônica, como também feito por Silva et al. (2016) que de amostras derivadas de um animal localizado no estado Acre dentro da região Amazônica, foi identificado que BPV presente na amostra 04AC14 é claramente um novo membro do gênero *Xipapillomavirus*. Ainda na região amazônica foi descoberto mais um novo tipo do BPV por Daudt et al. (2018) relatando que, a partir de amostras coletadas de animais do estado do Acre na região amazônica do Brasil, foi descoberto um novo tipo de BPV putativo chamado BPV24. Demonstrando com essas descobertas a importância da região amazônica para a realização de estudos.

Monteiro et al. (2008) explica que mesmo sendo capaz de identificar a infecção pelo BPV fazendo a utilização de outras técnicas, foi escolhida a técnica de PCR por ser mais rápida e possuir uma maior especificidade para a obtenção dos resultados. Sendo o mesmo teste utilizado para a realização deste trabalho, concordando com os benefícios da utilização desta técnica Haas e Torres (2016) realizou estudos em Belo Horizonte afirmando que, por conta de diversas qualidades a PCR se tornou uma ferramenta de diagnóstico preciosa e muito confiável para a realização de diagnóstico e monitoramento de doenças dos animais. Por estas vantagens ela é bastante indicada para a detecção de BPV como ressaltado por Silva et al. (2015) onde afirmam que a PCR permitiu a identificação de diversos novos tipos de BPV em carne bovina de várias regiões em todo o mundo. Sendo até então na nossa realidade considerada uma das mais indicadas na identificação dos BPV.

Os resultado apresentando neste trabalho foram abaixo comparado com os obtidos por Monteiro et al. (2008) relatam que de 40 amostras de diferentes tipos de papilomas cutâneos submetidas a testes moleculares foram encontrados bandas com

primers genéticos em 33 amostras (82,5%), demonstrando presença de vírus na propriedade localizada no Município de Ribeirão - PE. Outros autores também relatam resultados superiores, como Ataseven et al. (2016) que observou de 32 amostras incluindo 23 papilomas e 9 amostras de sangue coletadas em três províncias (Hatay, Adana e Osmaniye) na Turquia, o BPV foi detectado em 69,6% (16) amostras de papiloma e em 100% de sangue, totalizando 25 (78,1%) positivas. Sendo a quantidade de amostras bastante aproximada ao número utilizados neste trabalho, resultados ainda mais elevados foram observados por Freitas et al. (2007) que observou em testes realizados na Universidade Federal de Pernambuco, das 19 amostras de papilomas que foram coletados um total de 100% deram positivos, sendo que nas de sangue de 20 amostras 18 deram positivas (90%) para BPV. Todos os resultados apresentados por esses autores confirmam à alta ocorrência da doença em rebanhos acometidos. Embora alguns autores também tenham encontrado valores inferiores como em Tessele e Barros (2016) onde foram classificados 65 tumores encontrados em 544 lesões de bovinos de abatedouro frigorífico do Rio Grande do Sul, destes tumores 2 deles foram classificados como papilomas sendo um de tetos e um de mucosa do rúmen. Ainda assim não se pode afirmar uma baixa ocorrência, pois deve ser levado em conta que foram observados tumores de diversas origens não sendo somente papilomas, o que pode explicar o baixo número de identificação.

O principal *Papillomavírus* responsável por acometer o sistema digestório superior e o BPV-4 como explica Freitas et al. (2011) que o BPV-4 tem sido descrito como agente de papilomas do canal alimentar, mostrando especificidade para o epitélio mucoso. Podemos considerar a corrente sanguínea um meio para que o vírus consiga atingir o TGI concordando com descrito por Freitas et al. (2007) que sugere, o sangue periférico pode ser um caminho de disseminação para outros tecidos. Podendo ser considerado um meio para o vírus alcançar o TGI.

A papilomatose é uma patologia bastante comum no Brasil porém como observado por Silva et al. (2015) e Doorslaer et al. (2012) as Infecções por BPV muitas vezes podem ocorrer de forma assintomática. Passando assim por despercebido pelos produtores, o que pode fazer com que os casos sejam mais elevados do que os relatados, como afirma Rech et al. (2018) com um estudo realizado na Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ) explicam que, a papilomatose é bastante difundida, porém os números de casos são muito mais altos do que os descritos em literatura. Podendo então esse problema ser muito maior do que se tem conhecimento. Em algumas

regiões a papilomatose possui uma ocorrência elevada acometendo mais os animais de produção leiteira, assim como o afirmado por Schuch (2001) relatando que no Rio Grande do Sul a doença acomete todo o estado tendo uma maior frequência em propriedades leiteiras. Mas ainda assim essa é uma preocupação séria para a produção de animais de corte que também são fortemente acometidos por BPV, visando que os frigoríficos são utilizados em diversos estudos como ressaltado por Tessele e Barros (2016) explicando que, abatedouros frigoríficos são considerados fontes importantes para identificação de doenças que acometem animais de produção.

Sendo considerado uma doença de ocorrência elevada se faz necessário uma maior atenção sobre ela, mas Rech et al. (2018) relata que apesar de ser uma enfermidade mundialmente distribuída, devido ela ter uma baixa taxa de letalidade pode ser notado uma negligência por parte de alguns produtores, onde não dão a devida atenção à os prejuízos causados pela doença, se tornando ainda mais difícil de reduzir os prejuízos causados. Nos abatedouros frigoríficos as condenações são regidas pelo RIISPOA (2017, p. 33) que estabelece no Art. 150. Parágrafo único. Os intestinos ou suas partes que apresentem nódulos em pequeno número podem ser liberados. Não sendo específico para a papilomatose e sim para a presença de nódulos independente da causa. O RIISPOA (2017, p. 35) estabelece ainda Art. 165. As carcaças de animais com neoplasias extensas que apresentem repercussão no seu estado geral, com ou sem metástase, devem ser condenadas. Essas neoplasias podem ou não envolver os papilomas já que o regulamento não especifica a causa, pois como explicado por Freitas et al. (2011) Quando ocorre a infecção dependendo do tipo viral e dos cofatores ambientais, podem causar sintomas angustiantes nos bovinos incluindo câncer do trato gastrointestinal superior. Sendo assim a papilomatose dependendo do grau de acometimento pode acarretar em condenação de carcaça.

A papilomatose necessita de mais estudos por conta de sua importância, Marins (2004) após realizar estudos em Campos Dos Goytacazes afirma que entre as doenças diagnosticadas nos bovinos, as infecções virais são as de maior ocorrência, merecendo destaque entre elas a papilomatose. Estando de acordo com o que já foi relatado por autores citados neste trabalho, enfatizando a alta ocorrência da papilomatose nos rebanhos brasileiros. Tessele e Barros (2016) explicam que os papilomas consistem em 3% de todos os tumores, temos conhecimento de que são

tumores comumente observados em bovinos. Apresentando assim concordância com o destaque da papilomatose nos rebanhos. Villiers et al. (2004) também explicam com estudos realizados na Universidade da Califórnia nos EUA que, os PVs podem coexistir com seu hospedeiros por períodos prolongados de tempo. Estando assim coerente com o fato de a papilomatose muitas vezes depender de uma baixa na imunidade para poder afetar o animal. Sendo que algumas dessas baixas na imunidade podem ser proporcionadas por cofatores externos como é o caso da ingestão da samambaia (*Pteridium aquilinum*) estando de acordo com o afirmado por Fernandes (2018) que realizou um estudo na Universidade Federal de Sergipe explicando que, dependendo do tipo de BPV se ocorrer influência de cofatores externos as lesões podem se tornar malignas passando a ser chamados de papilomatoses ou fibropapilomas malignos.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados a partir de amostras coletadas do rúmen foi possível avaliar a ocorrência do *Papillomavírus* nas lesões, onde evidenciou também uma grande quantidade de animais que apresentaram a doença no rúmen mesmo que o BPV de rúmen seja pouco diagnosticado, quando o animal apresenta a forma cutânea da doença deve ser levado em conta o risco de infecção do TGI pela corrente sanguínea. Com os resultados apresentados é possível afirmar a ocorrência positiva de *Papillomavírus* de rúmen na região central do estado de Rondônia, podendo ser demonstrado a diversidade viral presente na Amazônia.

6 REFERÊNCIAS

ARALDI, R. P. **Isolamento e identificação do papilomavírus bovino em grupo experimental de bovinos para a obtenção de um banco de vírus**. São Paulo: Instituto Butantan, 2014.

ATASEVEN, V. S.; KANAT, Ö.; ERGÜN, Y. Molecular identification of bovine papillomaviruses in dairy and beef cattle: first description of Xi- and *Epsilonpapillomavirus* in Turkey. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, n. 40, p. 757-763, 2016.

BARROS, G. S. **Análise transcriptômica comparativa da infecção por papilomavírus bovino**. São Cristóvão: Universidade Federal De Sergipe, 2018.

BATISTA, M. V. A. **Uso de novas ferramentas computacionais no estudo da diversidade genética de papilomavírus bovino associado à epidemiologia molecular da papilomatose bovina cutânea**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

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.

BOOM, R.; et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BORZACCHIELLO, G. Bovine Papillomavirus infections in animals. **FORMATEX**, p. 673-679, 2007.

BRASIL - Ministério da Agricultura. R.I.I.S.P.O.A. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*, (Aprovado pelo decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017), Brasília: p. 01-108, 2017.

CAMARGO, C. F.; SILVA, P. R. Q. **Aplicação das técnicas de PCR e suas técnicas derivadas em Diagnóstico molecular**. Goiás: Universidade Católica de Goiás – IFAR, 2011.

CECCATTO, V. M. **Biologia Molecular**. 2.ed. Fortaleza: EdUECE, 2015.

CNABRASIL. <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/producao-e-exportacao-mundial-de-carne-de-vera-crescer-em-2018> último acesso em 23/05/2020

DAUDT, C.; et al. Bovine papillomavirus 24: a novel member of the genus Xipapillomavirus detected in the Amazon region. **Archives of Virology**, n. 164, p. 637–641, 2018.

DAUDT, C.; et al. Complete genome sequence of Deltapapillomavirus 4 (bovine papillomavirus 2) from a bovine papillomavirus lesion in Amazon Region, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 04, p. 277-279, 2016.

DOORSLAER, K. V. et al. Episteme do Papilomavírus: um recurso central para análise e dados de sequências de papilomavírus, **Nucleic Acids Research**, vol. 41, p. 571- 578, 2012.

FERNANDES, A. O. **Identificação e caracterização funcional de genes virais relacionados com a papilomatose bovina**. São Cristóvão: Universidade Federal de Sergipe, 2018.

FERNANDES, J. V.; et al. Biology and natural history of human Papillomavirus infection. **Open Access Journal of Clinical Trials**, n. 05, p. 01-12, 2013.

FERNANDES, M. C.; et al. Papilomatose oral em cães: revisão da literatura e estudo de doze casos. **Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 215-224, 2009.

FERREIRA, T.; WAGNER, W.; FICAGNA, V. C. Tratamento homeopático da papilomatose bovina. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 2, n. 15, p. 355-356, 2017.

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. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 9, p. 2437–2443, 1999.

FREITAS, A. C.; et al. Papillomavírus DNA detection in non-epithelial tissues: a discussion about Bovine Papillomavírus. In: Mendez-Villas A, editor. Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology, **Formatex**, p. 697–704. 2007.

FREITAS, A. C.; et al. Recent insights into Bovine Papillomavírus. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 33, p. 6004-6012, 2011.

GARSZARECK, O. L. Intoxicação de bovinos por ingestão de samambaia (pteridium aquilinum). **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** V. 8, n. 15, p. 1-8, 2010.

GONÇALVES, G. B.: et al. Teste de eficácia entre o uso da hemoterapia e da autovacina como protocolos de tratamentos contra papilomatose bovina. **Multi-Science Journal**, v. 2, n. 1, p. 89-92, 2019.

HAAS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de pcr no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 26 – Janeiro de 2016, 2016.

HAGA, T.; DONG, J.; ZHU, W.; BURK, R. The many unknown aspects of bovine papillomavirus diversity, infection and pathogenesis. **The Veterinary Journal**, n. 197, p. 122–123, 2013.

HARTMANN, W.; VIEIRA, A. C. N.; DIEDRICHS, T. N.; FUNAYAMA, S.; HILL, J. A. G. Vacina autógena para o tratamento da papilomatose bovina. **Ciência e Cultura**, v. 02, n. 31, p. 107-112, 2002.

HATAMA, S.; NOBUMOTO, K.; KANNO. T. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, bpv-9 and bpv-10. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 158-163, 2008.

ICTV Report Consortium. **ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae**, **Journal of General Virology**, 2019. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. último acesso em 23/05/2020

LEE, C.; LAIMINS, L.A. The Differentiation-Dependent Life Cycle of Human Papillomaviruses in Keratinocytes In: GARCEA, L. R. **The Papillomavirus**. Nova York: Springer Science, p.45-67, 2007.

MARINS, R. S. Q. S. **Epidemiologia da papilomatose cutânea bovina e avaliação da eficácia de diferentes tratamentos em micro-regiões dos estados do Rio de**

Janeiro e Espírito Santo. Campo dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2004.

MASUDA, E. K. **Patogênese dos carcinomas de células Escamosas alimentares associados ao Consumo de *pteridium aquilinum* em bovinos.** Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

MONTEIRO, V. L. C. Uso da *Thuya occidentalis* no tratamento da papilomatose bovina: aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares. **Medicina Veterinária**, v.1, n.1, p.93-94, 2007.

MONTEIRO, V. L. C.; et al. Descrição clínica e histopatológica da papilomatose cutânea Bovina (BPV). **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 1079-1088, 2008.

MONTEIRO, V. L. C.; et al. Uso da reação em cadeia da polimerase na detecção da papilomatose bovina no Estado de Pernambuco. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v.2, n.2, p.9-15, 2008.

PATRÍCIO, A. M. P. C. **As principais afecções gástricas dos bovinos.** Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2012.

PRADO, M. H. J. **Caracterização genética de papilomavírus abrangendo três diferentes gêneros identificados em uma lesão epitelial de bovino.** Porto Alegre: Universidade federal do rio grande do sul, 2017.

RECH, G.; et al. Papilomatose bovina – revisão de literatura. **XXIII seminário interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão**, V. 23, p. 01- 04, 2018

REIS, M. O.; et al. Neoplasmas bovinos diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS, Porto Alegre (2005-2014)¹. **Pesq. Vet. Bras.** V. 37, n. 2, p. 105-109, 2017.

RIVOIRE, W.A.; CORLETA, H. V. E.; BRUM, I.S.; CAPP, D. Biologia molecular do câncer **cervical**. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, v. 6, n. 4, p. 447-451, 2006.

ROPERTO, S. et al. Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: Possible biological role. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 12, p. 3027–3033, 2008.

SANTIN, A. P. I.; BRITO, L. A. B. Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 1, p. 39-45, 2004.

SCHUCH, L. F. D. Papilomatose bovina. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 2. ed. São Paulo: Varela Editora e Livraria LTDA, p. 144–147, 2001.

SILVA, F. R. C.; et al. Genetic characterization of Amazonian bovine papillomavirus reveals the existence of four new putative types. **Virus Genes**, v. 51, n. 1, p. 77–84, 2015.

SILVA, F.R.C.; et al. Novel Bovine Papillomavirus Type Discovered by Rolling-Circle Amplification Coupled with Next-Generation Sequencing. **PLOS ONE** v.11, n.9, p.1-11, 2016.

SILVA, L. A. F.; et al. Eficiência da repetição de diferentes protocolos de Tratamentos para papilomatose bovina. **Revista da FZVA**, v.11, n.1, p. 153-165, 2004.

SILVA, M. C. S.; et al. Procedimentos terapêuticos em caso grave de papilomatose bovina. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 2, n. 15, p. 379-380, 2017.

SOUTO, M. A. M.; et al. Neoplasias do trato alimentar superior de bovinos associadas ao consumo espontâneo de samambaia (*Pteridium aquilinum*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 26, p. 112-122, 2006.

TESSELE, B.; BARROS, C. S. L. Tumores em bovinos encontrados em abatedouros frigoríficos. **Pesq. Vet. Bras.**, V. 36, n. 3, p. 145-160, 2016.

TOZATO, C. C. **Análise filogenética de papilomavírus bovino (bpv) identificados a partir de lesões epiteliais da glândula mamária de vacas leiteiras**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2011.

VILLIERS, E. M.; et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 20, n. 324, p. 17-27, 2004.