

PATRÍCIA GALLINDO CARRAZZONI

**ESTUDO CLÍNICO, LABORATORIAL E BIOMOLECULAR DE REBANHO
LEITEIRO PARA PRODUÇÃO DE BIOTERÁPICO DE PAPILLOMAVIRUS
BOVINO**

RECIFE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO-PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

PATRÍCIA GALLINDO CARRAZZONI

**ESTUDO CLÍNICO, LABORATORIAL E BIOMOLECULAR DE REBANHO LEITEIRO
PARA PRODUÇÃO DE BIOTERÁPICO DE PAPILOMAVIRUS BOVINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Cardoso
Coelho

Co-orientador:

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

RECIFE
2015

Ficha catalográfica

C313e Carrazzoni, Patricia Gallindo
Estudo clínico, laboratorial e biomolecular de rebanho
leiteiro para produção de bioterápico de Papillomavirus
Bovino / Patricia Gallindo Carrazzoni. – Recife, 2015.
139 f. : il.

Orientador(a): Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho.
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2015.
Referências.

1. Isoterapia 2. Papilomatose cutânea 3. Lesões
cutâneas 4. Sangue 5 . BPV I. Coelho, Maria Cristina de
Oliveira Cardoso, orientadora II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO-PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ESTUDO CLÍNICO, LABORATORIAL E BIOMOLECULAR DE REBANHO LEITEIRO
PARA PRODUÇÃO DE BIOTERÁPICO DE PAPILOMAVIRUS BOVINO**

Tese de Doutorado elaborada por

PATRÍCIA GALLINDO CARRAZZONI

Aprovada em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho
Orientadora – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas
Co-orientador– Departamento de Genética da UFPE

Dra. Vanda Lúcia da Cunha Monteiro
– Médica Veterinária

Prof. Dr. Wagner McKlayton Alves de Souza
– Departamento de Medicina Veterinária UNINASSAU

Profa. Dra. Lílian Sabrina Silvestre de Andrade
– Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

A Fernando e às minhas pequenas Nana e Tici.

Dedico este trabalho com todo amor à nossa família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo e sempre. Por estar ao meu lado em mais esta caminhada e me carregar no colo nas dificuldades do caminho.

Aos meus pais, pela formação e educação, pelo incentivo, por acreditarem em mim e por tantas vezes suprirem minha ausência com as meninas durante a realização deste trabalho.

Agradeço a Fernando por ser parte de tudo. Por participar de todas as etapas, pelos conselhos, opiniões, incentivo, por me fazer rir, ser pai dedicado e principalmente por formarmos uma família linda, que é a base de tudo.

Às minhas duas pequenas, Nana e Tici. Com elas veio uma força, uma determinação e coragem que só o amor de mãe é capaz. Agradeço principalmente pelos sorrisos, pelas gracinhas e carinho que apagam qualquer tristeza, qualquer cansaço e preocupação.

À professora Cristina Coelho, minha orientadora por tantos anos, pela amizade e por ter contribuído com minha formação desde 1996.

Agradeço ao professor Antonio Carlos por tão delicadamente ter me acolhido no laboratório, pela disponibilidade e orientação que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) por me dar todas as condições para realização deste Doutorado, em especial a Aluizio Low e Antonio Santana, que foram fundamentais para minha liberação e afastamento.

Aos amigos do LEMTE, em especial Angélica e Morse, aos funcionários do IPA Estação de Itambé, à Lana e ao professor Hélio Manso, agradeço pela participação na execução, por compartilhar as preocupações e pelos muitos momentos de descontração e alegria.

A realização de um doutorado só é possível com a participação e colaboração de um conjunto de pessoas. A todos que direta e indiretamente contribuíram com a realização deste projeto sou profundamente grata. Seria impossível sem vocês.

“Existem ainda muitas coisas a serem aprendidas com o BPV. Não é exagero afirmar que o estudo do BPV borrou a linha divisória entre a medicina humana e a medicina veterinária.”

Maria Saviera Campo

RESUMO

Título: ESTUDO CLÍNICO, LABORATORIAL E BIOMOLECULAR DE REBANHO LEITEIRO PARA PRODUÇÃO DE BIOTERÁPICO DE PAPILOMAVIRUS BOVINO

O Papillomavirus Bovino e a papilomatose cutânea estão amplamente difundidos no rebanho brasileiro causando perdas econômicas significativas. Os tratamentos existentes são dispendiosos, ineficazes e não há vacinas comerciais disponíveis, sugerindo a pesquisa por medicamentos viáveis e seguros. Dentre os medicamentos homeopáticos, os bioterápicos são produzidos a partir de produtos ou tecidos do paciente e utilizam o próprio agente causal da doença para estimular o organismo a promover a cura. Neste contexto, teve-se como objetivo acompanhar bovinos leiteiros naturalmente infectados por BPV, caracterizar os aspectos clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e moleculares do rebanho, para, a partir do sangue e lesões dos animais estudados produzir e avaliar bioterápico de *Papillomavírus Bovino*. O trabalho foi desenvolvido no Instituto Agrônomo de Pernambuco e no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental da Universidade Federal de Pernambuco. A propriedade foi avaliada quanto à localização, estrutura física, manejo nutricional, reprodutivo e sanitário do rebanho. Dentre os animais da propriedade, foram acompanhadas 92 fêmeas bovinas, das quais foram coletados 35 fragmentos de lesões cutâneas e 89 amostras sanguíneas. Destas amostras, foram realizados hemogramas, extração de DNA, identificação e genotipagem de BPV, e produzidos dois bioterápicos de Papillomavirus Bovino. BiotSan, produzido a partir do *pool* de amostras de sangue e BiotLes, produzido a partir de um *pool* de lesões cutâneas, ambos seguindo a Farmcopia Homeopática Brasileira na diluição D30. Os bioterápicos prontos foram avaliados por biologia molecular quanto à presença do vírus nas diluições D1 a D30. O estudo caracterizou os aspectos epidemiológicos da propriedade, os aspectos clínicos e laboratoriais do rebanho, a infecção dos animais pelo BPV, o desenvolvimento, características e evolução clínica das lesões em 24 meses, a frequência e comparação dos tipos virais no sangue e lesões cutâneas. Os resultados mostraram que todos os animais estavam infectados pelo BPV, as avaliações hematológicas indicaram evidência de doença crônica no rebanho, semelhante entre animais sintomáticos e assintomáticos. Foi identificado comprometimento reprodutivo do rebanho, indicando ser causado pela infecção com os BPVs. A papilomatose cutânea leve com lesões do tipo atípico basal único foi a mais frequente e não houve regressão das lesões no período estudado. A presença de múltiplos tipos virais no sangue e lesões foi identificada em quase 100% das amostras, ocorreu com vários tipos virais, sem relação com localização, tipo ou gravidade das lesões e não foi determinante para o desenvolvimento de lesões cutâneas e sintomatologia clínica. Os tipos virais presentes no sangue e lesões do rebanho foram semelhantes e não diferiram entre animais sintomáticos e assintomáticos. BPV2 e BPV3 foram os tipos mais frequentes nas lesões e BPV10 e 12 no sangue. Os tipos virais BPV11 e 12 foram identificados pela primeira vez em Pernambuco em amostras de sangue e lesões. As técnicas empregadas para produção e avaliação dos bioterápicos BiotLes e BiotSan foram eficazes e a análise molecular mostrou composição por tipos virais dos gêneros Delta, Epsilon e Xipapillomavirus, ideal para indução de resposta imune específica do BPV. A diluição D30 destes bioterápicos, no entanto, apresenta fragmentos virais, não sendo recomendada para utilização no tratamento e prevenção da doença em bovinos, indicando a necessidade de novos estudos para determinar a diluição homeopática para qual inexistam partículas virais.

PALAVRAS-CHAVE: isoterapia, papilomatose cutânea, BPV, sangue, lesões cutâneas

ABSTRACT

Title: CLINICAL, LABORATORY AND BIOMOLECULAR STUDY OF DAIRY HERD FOR PAPILLOMAVIRUS BOVINO BIOTHERAPIC PRODUCTION

The Bovine Papillomavirus and cutaneous papillomatosis are widespread in the Brazilian herd causing significant economic losses. Existing treatments are costly, ineffective and there is no commercial vaccines available, suggesting the search for viable and safe medicines. Out of the homeopathic medicines, biotherapics are produced from products or tissues of the patient and use the causal agent of the disease to stimulate the body itself to promote healing. In this context, the aim of the study was to accompany dairy cattle naturally infected with BPV, characterize the clinical, epidemiological, laboratorial and molecular aspects of the herd, for, from the blood and lesions of animals studied produce and evaluate biotherapic of Bovine Papillomavirus. The study was conducted at the Agronomic Institute of Pernambuco and at the Laboratory of Molecular Research and Experimental Therapy (LEMTE) of the Federal University of Pernambuco. The property was evaluated as the location, physical structure, nutritional, reproductive and sanitary management of the herd. Among the animals of the property, 92 cows were accompanied, of these, 35 fragments of skin lesions and 89 blood samples were collected. From these samples, blood tests, DNA extraction, identification and genotyping of BPV were carried out, and two Bovine Papillomavirus biotherapics produced: BiotSan produced from a pool of blood samples and BiotLes produced from a pool of skin lesions, both following the Brazilian Homeopathic Farmcopeia in D30 dilution. The ready biotherapic were evaluated by molecular biology regarding the presence of the virus in D1 to D30 dilutions. The study characterized the epidemiological aspects of the property, clinical and laboratory aspects of the herd, the infection of animals by BPV, development, characteristics and clinical evolution of the lesions in 24 months, the frequency and comparison of viral types in the blood and cutaneous lesions. The results showed that all the animals were infected with BPV, hematologic evaluations indicated evidence of chronic disease in the herd, similar in symptomatic and asymptomatic animals. Reproductive impairment of the herd was identified and could be caused by infection with BPVs. A mild cutaneous papillomatosis with the single basal atypical type injury was the most frequent and there was no regression of the lesions during the study period. The presence of multiple viral types in the blood and lesions was detected in almost 100 % of the samples, took place with various viral types, without regard to location, type or severity of injuries and it was not decisive for the development of skin lesions and clinical symptoms. Viral types present in the blood and lesions were similar and did not differ between symptomatic and asymptomatic animals. BPV2 and BPV3 were the most frequent types of lesions and BPV10 and 12 in the blood. The viral types BPV11 and 12 were first identified in Pernambuco in samples of blood and lesions. The techniques employed for the production and evaluation of BiotLes and BiotSan biotherapic were effective and molecular analysis showed composition with viral types of genres Delta, Epsilon and Xipapillomavirus, ideal for induction of specific immune response of BPV. The dilution D30 of biotherapics, however, presents viral fragments, which does not recommend for use in the treatment and prevention of disease in cattle, indicating the need for further studies to determine the homeopathic dilution for which there be no viral particles.

KEY WORDS: isotherapy, cutaneous papillomatosis, autoisotherapic, organic management

LISTA DE FIGURAS

	Página
Revisão	
Figura 1. Organização genômica de BPV1. Fonte: Freitas et al., 2011.....	17
Figura 2. Espécies de <i>Papillomavirus</i> que infectam animais domésticos. Fonte: Adaptado de Lunardi, et al., 2013.....	20
 Artigo I	
Figura 1. Demonstração esquemática do rebanho acompanhado e frequência de BPV nos animais estudados.....	63
Figura 2. Idade dos animais, condição de infecção e presença de lesões cutâneas em bovinos naturalmente infectados por BPV - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).....	64
Figura 3. Eritrograma, PPT e Fibrinogênio de bovinos infectados por BPV apresentando ou não lesões cutâneas- Itambé, Pernambuco (2015).....	65
Figura 4. Parâmetros leucocitários de bovinos infectados por BPV apresentando ou não lesões cutâneas- Itambé, Pernambuco (2015).....	66
Figura 5. Índices reprodutivos de fêmeas infectadas por BPV apresentando ou não lesões cutâneas - Itambé, Zona da Mata (2015).....	67
 Artigo II	
Figura 1. Idade dos animais e quantidade de lesões cutâneas em bovinos naturalmente infectados por BPV - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).....	83
Figura 2. Aspectos macroscópicos das lesões papilomatosas observadas. A - papilomas filamentosos localizados no teto, com aspecto fibroso. B - papilomas do tipo típico pedunculado. C - papiloma atípico engastado. D - papiloma atípico basal, com aspecto achatado. E - associação de vários tipos de papilomas. F - papilomas recobrimdo grande extensão de pele. Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.	84
Figura 3. Frequência dos tipos de lesões cutâneas em papilomatose leve, moderada e intensa em bovinos naturalmente infectados por BPV - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.	85
Figura 4. Localização de lesões cutâneas em bovinos naturalmente infectados por BPV - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.	86
Figura 5. Aspectos macroscópicos, localização e tipos de BPV em lesões cutâneas de bovinos leiteiros - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.	87

	Página
Figura 6. Frequência dos tipos de BPVs encontrados em lesões cutâneas de fêmeas bovinas leiteiras - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.	88
Figura 7. Co-infecção em lesões cutâneas por BPVs agrupados filogeneticamente - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).....	89
Figura 8. Tipos de papilomas observados (seta). A - papiloma atípico engastado, semelhante a uma reação alérgica, com presença de pelos e B - papilomas atípicos basais únicos. - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2014).....	90
 Artigo III	
Figura 1. Perfil da idade e desenvolvimento de lesões cutâneas em bovinos naturalmente infectados por BPV - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).....	106
Figura 2. Distribuição dos tipos e gêneros de BPVs em lesões cutâneas coletadas de fêmeas bovinas - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).....	107
Figura 3. Distribuição dos tipos e gêneros de BPVs no sangue de fêmeas bovinas leiteiras - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).....	108
Figura 4. Associação de vírus e grupos filogenéticos de BPV em lesões cutâneas de fêmeas bovinas leiteiras - Itambé, Pernambuco (2015).....	109
Figura 5. Associação de vírus e grupos filogenéticos de BPV em amostras de sangue de fêmeas bovinas - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).....	110
Figura 6. Comparação dos tipos de BPVs no sangue e lesões de 16 fêmeas bovinas acometidas pela papilomatose cutânea - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).....	111
Figura 7. Tipos de BPVs no sangue de fêmeas bovinas leiteiras sintomáticas e assintomáticas - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).....	112
Figura 8. Frequência de co-infecção de BPVs em bovinos sintomáticos e assintomáticos - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).....	113
 Artigo IV	
Figura 1. Tipos de BPVs encontrados nos bioterápicos BiotLes e BiotSan nas diluições D1, D5, D10, D15, D20, D25 e D30 - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).	130
Figura 2. Frequência dos tipos de BPVs encontrados em amostras de sangue e lesões cutâneas de fêmeas bovinas leiteiras - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).	131

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Papilomavírus: aspectos gerais	15
2.2 Genoma e Estrutura Viral	16
2.2.1 Proteínas virais	17
2.3 Taxonomia e Classificação dos PVs	18
2.4 Papillomavírus Bovino – BPV	21
2.5 Papilomatose Cutânea Bovina	25
2.6 Homeopatia	33
2.6.1 Princípios básicos da Homeopatia	35
2.7 Isoterapia e Bioterápicos	38
3 REFERÊNCIAS	40
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	51
4.1 Artigo 1 Estudo epidemiológico, clínico-laboratorial e possível impacto na reprodução de bovinos leiteiros infectados por <i>Papillomavirus Bovino</i> (BPV) ...	52
4.2 Artigo 2 Tipos virais, co-infecção e evolução das lesões de bovinos apresentando papilomatose cutânea	68
4.3 Artigo 3 Sangue e lesões de animais sintomáticos e assintomáticos infectados por <i>Papillomavírus Bovino</i>	91
4.4 Artigo 4 Caracterização molecular de bioterápicos de <i>Papillomavirus Bovino</i> produzidos a partir do sangue e lesões de animais naturalmente infectados.	114

1. INTRODUÇÃO

O Papilomavirus Bovino (BPV) através de seus tipos virais é responsável por causar lesões tumorais benignas e três síndromes clínicas principais nos bovinos, seus hospedeiros naturais: (1) a papilomatose cutânea, (2) tumores do trato gastrointestinal (TGI), que em associação ao consumo da samambaia podem se transformar em câncer, e (3) lesões da bexiga e trato urinário que também concomitante à ingestão da planta agravam o quadro clínico com surgimento da Hematúria Enzoótica Bovina (HEB) (Campo 1994, 1997, 2002, 2003).

A papilomatose cutânea embora menos grave sob o ponto de vista da malignidade das lesões, ocorre em todo o Brasil e independe da presença da samambaia (*Pteridium aquilinum*), o que a torna mais frequente, mais disseminada e geradora de grandes prejuízos aos produtores (Campo 1992).

A presença de lesões únicas, aglomeradas, pequenas, grandes, localizadas ou disseminadas em todo o corpo acometem os animais em áreas específicas gerando quadros clínicos diferenciados. Papilomas na região dos olhos dificultam a movimentação do animal, a alimentação e a defesa de obstáculos. Nos tetos, impedem a saída do leite, mamada dos bezerros e podem causar mastite. Na região vulvar e peniana dificultam a reprodução. Quando aglomerados geram sangramentos após atrito com cercas, cochos ou outros animais, podendo levar a miíases e infecções secundárias. Estudos relatam o comprometimento de células e órgãos reprodutivos sugerindo a transmissão vertical e favorecendo a disseminação da doença (Freitas et al., 2003).

A relevância da papilomatose cutânea bovina está associada à ocorrência das lesões que independente da forma em que se apresentam ou onde se localizam geram prejuízos econômicos por perda e redução no ganho de peso, queda na produção leiteira, menor taxa de desfrute, desvalorização de animais de alto valor zootécnico e morte. Outro fator agravante, é que os produtores não identificam a papilomatose cutânea como causa primária dessas perdas, negligenciando a presença de poucos casos ou poucas lesões na propriedade, potencializando a infecção no rebanho (Muro et al., 2008).

Pesquisas estimam, por não haver estudos publicados, que 60% do rebanho bovino brasileiro está infectado com algum tipo de BPV. Outros autores citam que dentro de um rebanho esta taxa pode chegar a 75%. A doença está amplamente difundida no rebanho nacional e é estimado que o número de casos seja expressivamente mais elevado do que o descrito na literatura (Silva et al. 2004; Catroxo et al., 2013; Araldi, 2014).

Estes dados são alarmantes quando se analisa o Brasil, maior exportador mundial de carne e sexto maior produtor de leite (MAPA, 2015), apresentando mais da metade do seu rebanho acometido por um vírus endêmico, responsável por perda expressiva na produção de carne e leite, para o qual não há vacina comercializada e tratamento eficaz, demonstrando que estar-se diante de um grave problema de ordem econômica.

Muitos estudos foram desenvolvidos para conhecimento da biologia, epidemiologia, e patogenia do vírus. Estas pesquisas utilizaram os animais como modelo de estudo para conhecimento do HPV (Papiloma vírus Humano) e foram principalmente direcionadas ao entendimento do potencial oncogênico do vírus, a malignização das lesões na presença de cofatores ambientais e ao desenvolvimento de vacinas curativas e profiláticas, ainda sem sucesso (Nicholls e Stanley, 2000; Campo, 2002; Borzacchiolo e Roperto 2008; Bocaneti et al; 20013).

Os tratamentos não têm sido alvo dos grupos de pesquisa e os existentes são pouco eficazes, no entanto, na presença de um rebanho mundialmente infectado é necessária à busca por tratamentos capazes de impedir o desenvolvimento da doença clínica nos portadores, regredir as lesões já estabelecidas, promovendo a cura dos doentes e permitir profilaxia de novos infectados (Campo, 1993; Veiga et al., 2000; Marins, 2004).

Atualmente, e cada vez mais, a sociedade consumidora e produtores exigem que além de eficazes os medicamentos sejam também seguros do ponto de vista toxicológico, residual, que respeitem o meio ambiente, o bem-estar animal e apresentem um custo real passível de compra (Marinho, 2008; Luz et al., 2013).

Neste contexto, os medicamentos homeopáticos vem se desenvolvendo no meio agropecuário por atender às necessidades demandadas pela sociedade e pecuaristas de pequeno, médio e grande porte, apresentando resultados satisfatórios no tratamento de condições clínicas como mastite, endo e ecto parasitoses (Mitidiero, 2002).

Dentro da homeopatia, os bioterápicos representam outro seguimento, com outra perspectiva de tratamento. Utilizam o agente causador da doença para ele mesmo induzir a cura, o que está diretamente relacionado às características imunológicas tipo-específicas induzidas pelos BPVs. Ainda não foram relatados no tratamento da papilomatose e diante das características de seguridade e custo podem representar uma importante ferramenta no controle da doença, sendo, portanto, o desenvolvimento de bioterápico para tratamento da papilomatose bovina o objetivo deste trabalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Papilomavírus: aspectos gerais

Os Papilomavírus (PVs) pertencem a um diverso grupo de pequenos DNA vírus, não envelopados, circulares e de dupla-fita, que acometem mamíferos, inclusive humanos, aves e répteis, infectam células basais do epitélio mucoso e cutâneo levando à formação de lesões hiperproliferativas, conhecidas como papilomas ou verrugas, de caráter benigno com tendência à regressão que, no entanto, na presença de co-fatores podem se transformar em câncer (Freitas et al., 2003; Monteiro et al., 2008; Pessoa, 2009; Bernard et al., 2010; Silva et al., 2011).

São considerados espécie-específicos, mas em condições naturais há relatos na literatura de infecção cruzada entre espécies como no caso dos equinos (Nasir e Campo, 2008; Silvestre et al., 2009; Pangty et al., 2010; Kumar et al., 2013).

A nomenclatura desses vírus ocorre de acordo com seu hospedeiro incluindo uma ou duas letras antes da sigla PV seguida do tipo viral, como por exemplo, BPV-1, que caracteriza o *Bos taurus Papillomavirus 1* (Souza, 2013).

O Papilomavírus encontra-se amplamente disseminado em todo o mundo sendo na década de 1930 o primeiro DNA oncovirus identificado, denominado CRPV (cottontrail rabbit papillomavírus) encontrado em verrugas de coelhos. Desde então inúmeras pesquisas vem sendo desenvolvidas em bovinos (BPV), coelhos (CRPV) e caninos (COPV), utilizados como sistemas modelos de estudo da biologia viral, interação com o hospedeiro natural, fatores ambientais co-carcinogênicos e resposta imune à infecção (Lunardi et al., 2013).

Os resultados obtidos com esses modelos animais de estudo contribuíram de forma decisiva para a identificação oficial do HPV-16 e HPV-18 como vírus carcinogênicos para humanos (WHO, 1995) e vem colaborando na elucidação da patogênese dos papilomavírus, seu potencial oncogênico, a relação entre vírus e co-fatores e o desenvolvimento de vacinas terapêuticas e profiláticas para humanos e animais (Campo, 1992, 1994, 1995, 1997, 2002, 2003, 2006; Borzachiello et al., 2009).

2.2 Genoma e Estrutura Viral

Na década de 70 a clonagem do genoma dos PVs contribuiu para o estudo das propriedades biológicas e bioquímicas do vírus e permitiu a identificação de diferentes Open Reading Frames (ORFs) como prováveis genes virais (Gottschling et al., 2007; Pessoa, 2009).

A organização genômica dos vários papilomavírus é extremamente similar. Apresentam estrutura icosaédrica, variando de 55 a 60 nanômetros (nm) de diâmetro, não envelopados, com capsídeo formado de 72 capsômeros (60 hexaméricos e 12 pentaméricos), molécula única de DNA dupla fita circular com tamanho aproximado de 8.000 pares de bases (pb), complexado com histonas e pesando cerca de $5,6 \times 10^2$ Daltons (Da) (Nasir et al., 2007; Campo, 2002; Souza, 2013).

O genoma viral está contido dentro do capsídeo esférico e a informação genética está distribuída em três principais regiões (Borzacchiello e Roperto, 2008; Melo, 2009; Freitas et al., 2011)(Figura 1):

Região de transcrição precoce (E-early), compreende até 8 ORFs que codificam as seis proteínas não-estruturais e regulatórias mais comuns, E1, E2, E4, E5, E6 e E7 que se expressam nas células basais ou durante os estágios intermediários de maturação;

Região de transcrição tardia (L-late), usualmente contém 2 ORFs que codificam as duas proteínas estruturais do vírus expressas em queratinócitos no final do estágio de maturação;

Região predominante de controle (LCR), terceira região, sem ORFs, não codificante, tem sido identificada nos genomas de todos os PVs e contém a origem da replicação bem como elementos que controlam a transcrição do DNA do vírus.

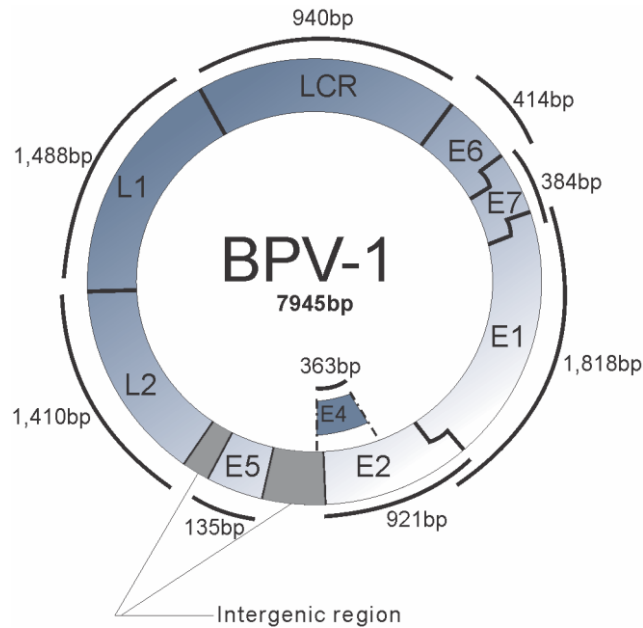


Figura 1. Organização genômica de BPV1. Fonte: Freitas et al., 2011.

2.2.1 Proteínas virais

A proteína viral E1, junto com E2, reconhece a origem da replicação e representa o fator central para replicação dos PVs. É indispensável para iniciação da replicação do DNA viral. A presença da ORF E1 intacta é crucial para manutenção da estabilidade do genoma viral, no entanto, a interação entre E1 e a origem da replicação apresenta pouca especificidade sendo necessária uma ligação cooperativa entre E1 e E2 para o reconhecimento eficiente da origem da replicação (Ham et al., 1991; Hedge, 2002;).

A ORF E2 codifica a proteína que compreende o sistema de controle regulatório central do vírus e com isso controla a expressão genética e replicação viral, além disso, participa da manutenção do genoma viral em sua forma epissomal promovendo a ligação entre estes genomas e cromossomos mitóticos do hospedeiro durante a divisão celular (Pessoa, 2009; Melo, 2009; Bocaneti et al., 2014).

E4 é uma proteína não estrutural, ocorre abundantemente no citoplasma de queratinócitos diferenciados dos papilomas e embora o gene que a codifica esteja localizado na região Early do genoma viral, E4 é produzida tardiamente no processo de diferenciação celular (Doobar et al., 2005).

As proteínas E5, E6 e E7 representam os primeiros fatores virais relacionados à progressão de lesões cancerígenas. Esses produtos genéticos sobrepõem-se à regulação negativa de crescimento da célula hospedeira e promovem a instabilidade genômica observada no câncer. E5 é uma proteína hidrofóbica associada à membrana que atua interrompendo o controle de crescimento celular (Souza, 2013). E7 aparenta cooperar com E5 e E6 para transformação celular, elevando a eficiência da transformação. E6 está ausente no BPV tipo 3, 4 e 6 (Campo, 2006).

L1 e L2 são proteínas estruturais expressas no núcleo dos queratinócitos e responsáveis pela formação do capsídeo viral. Em conjunto, atuam na conexão viral com os receptores celulares. L1 possui a capacidade de se auto organizar em VLPs (vírus like particles – partículas semelhantes ao vírus) sendo utilizada na produção de vacinas devido a sua imunogenicidade (Liu et al., 1998; Freitas et al., 2007).

A ORF L1 é a mais conservada do genoma e, por este motivo, tem sido utilizada para identificação de novos tipos de papilomavírus, classificação e construção de árvores filogenéticas (De Villiers et al., 2004).

O capsídeo é formado por 360 cópias da proteína L1 organizada em 72 capsômeros pentaméricos e 12 cópias da proteína L2. Embora presente em menor número, a proteína L2 é necessária para a morfogênese viral (Modis et al., 2002).

2.3 Taxonomia e Classificação dos PVs

Os Pvs foram inicialmente agrupados com os Polyomavirus na família *Papovaviridae* baseado em semelhanças morfológicas como capsídeo não envelopado e genoma do DNA de dupla fita circular característicos destes vírus. Estudos posteriores, no entanto, demonstraram diferentes tamanhos, organização e baixa similaridade entre seus nucleotídeos e sequência de aminoácidos, classificando os papilomavírus em uma nova família, a *Papillomaviridae* (Lunardi et al., 2013).

Os PVs são tradicionalmente denominados como “tipos virais”. Os termos taxonômicos “cepa” e “sorotipo” não são utilizados para papilomavírus uma vez que esses vírus não se desenvolvem em culturas celulares clássicas e não induzem resposta imune humoral significativa em seus hospedeiros. Consequentemente sua classificação é baseada nas similaridades na sequência de nucleotídeos e em um número limitado de propriedades médicas e biológicas (De Villiers et al., 2004; Fauquet et al., 2005).

Cada novo tipo viral apresenta uma divergência maior que 10% na sequência de nucleotídeos do gene L1. Por ser o mais conservado dentro do genoma do papilomavírus, o gene L1 tem sido utilizado em estudos para diferenciar os papilomavírus e classificá-los em tipos, subtipos e variantes (Souza, 2013; Batista et al; 2011).

Diferenças acima de 10% entre duas sequências de DNA da ORF de L1 definem um novo tipo de PV. Diferenças entre 2% e 10% identificam um novo subtipo viral enquanto que a definição de uma nova variante se dá com menos de 2% de divergência entre as sequências de L1. Diferentes gêneros apresentam menos de 60% de identidade na ORF L1 e diferentes espécies de um mesmo gênero apresentam entre 60 e 70% de similaridade (Lunardi et al., 2013).

Estudos sugerem que a grande diversidade de PVs pode ser explicada por mecanismos evolucionários como divergência vírus-hospedeiro, duplicação viral intra-hospedeiro, recombinação, variedades de tipos virais, adaptação aos mecanismos de defesa do hospedeiro, entre outros (Shah et al., 2010; Gottschiling et al., 2011).

Embora não esteja claro como estes mecanismos evolucionários atuam na diversidade dos PVs, vários estudos têm sido empregados para sua elucidação. São análises filogenéticas robustas, que fornecem a base do conhecimento contemporâneo para classificação dos PVs, o que é imprescindível para pesquisas médicas e veterinárias (Freitas et al., 2011).

Atualmente a família *Papillomaviridae* é constituída por pelo menos 29 gêneros e mais de 200 tipos virais, número sugerido como subestimado diante da diversidade conhecida dos PVs. Portanto, acredita-se que novos tipos, subtipos e variantes permanecem desconhecidos (Bernard et al., 2010; Batista et al; 2011; Bocaneti et al., 2014).

Entre os PVs identificados encontram-se 11 gêneros, 15 espécies e 28 tipos virais que acometem os animais domésticos como descrito na Figura 2. Dentre estes, o BPV tem sido extensivamente estudado e continua contribuindo com o estudo da papilomatose mundial (Lunardi et al., 2013).

Figura 2. Espécies de *Papillomavirus* que infectam animais domésticos. Fonte: Adaptado de Lunardi, et al., 2013

Gêneros	Espécies	Tipos Virais
<i>Deltapapillomavirus</i>	<i>Bos taurus Papillomavirus 1</i>	<i>Bos taurus Papillomavirus 1</i>
		<i>Bos taurus Papillomavirus 2</i>
		<i>Bos taurus Papillomavirus 13</i>
	<i>Ovis aries Papillomavirus 1</i>	<i>Ovis aries Papillomavirus 1</i>
		<i>Ovis aries Papillomavirus 2</i>
<i>Epsilonpapillomavirus</i>	<i>Bos taurus Papillomavirus 5</i>	<i>Bos taurus Papillomavirus 5</i>
		<i>Bos taurus Papillomavirus 8</i>
<i>Zetapapillomavirus</i>	<i>Equus caballus Papillomavirus 1</i>	<i>Equus caballus Papillomavirus 1</i>
<i>Lambdapapillomavirus</i>	<i>Canis familiaris Papillomavirus 1</i>	<i>Canis familiaris Papillomavirus 1</i>
	<i>Canis familiaris Papillomavirus 6</i>	<i>Canis familiaris Papillomavirus 6</i>
	<i>Felis domesticus Papillomavirus 1</i>	<i>Felis domesticus Papillomavirus 1</i>
<i>Xipapillomavirus</i>	<i>Bos taurus Papillomavirus 3</i>	<i>Bos taurus Papillomavirus 3</i>
		<i>Bos taurus Papillomavirus 4</i>
		<i>Bos taurus Papillomavirus 6</i>
		<i>Bos taurus Papillomavirus 9</i>
		<i>Bos taurus Papillomavirus 10</i>
		<i>Bos taurus Papillomavirus 11</i>
		<i>Bos taurus Papillomavirus 12</i>
<i>Taupapillomavirus</i>	<i>Canis familiaris Papillomavirus 2</i>	<i>Canis familiaris Papillomavirus 2</i>
		<i>Canis familiaris Papillomavirus 7</i>
<i>Phipapillomavirus</i>	<i>Capra hircus Papillomavirus 1</i>	<i>Capra hircus Papillomavirus 1</i>
<i>Chipapillomavirus</i>	<i>Canis familiaris Papillomavirus 3</i>	<i>Canis familiaris Papillomavirus 3</i>
		<i>Canis familiaris Papillomavirus 5</i>
	<i>Canis familiaris Papillomavirus 4</i>	<i>Canis familiaris Papillomavirus 4</i>
<i>Dyodeltapapillomavirus</i>	<i>Sus scrofa Papillomavirus 1</i>	<i>Sus scrofa Papillomavirus 1</i>
<i>Dyothetapapillomavirus</i>	<i>Felis domesticus Papillomavirus 2</i>	<i>Felis domesticus Papillomavirus 2</i>
<i>Dyoiotapapillomavirus</i>	<i>Equus caballus Papillomavirus 2</i>	<i>Equus caballus Papillomavirus 2</i>
-	-	<i>Bos taurus Papillomavirus 7</i>

Para nomenclatura dos gêneros, utiliza-se o alfabeto grego. A nomenclatura taxonômica de cada PV é baseada no nome científico do gênero e espécie dos seus hospedeiros. Como exemplo, FdPV1 é o nome dado ao PV que infecta os gatos (*Felis domesticus*). Uma exceção é o caso dos papilomavírus dos bovinos, que recebeu o nome *Bos taurus papilomavirus*, mas por consenso é usualmente denominado BPV (Bernard et al., 2010; Souza, 2013).

2.4 Papilomavírus Bovino - BPV

O Papilomavírus Bovino pertence à família *Papillomaviridae* apresenta treze genótipos identificados e classificados em três gêneros (Bocanetti et al., 2014).

Ao gênero *Deltapapillomavirus* pertence o BPV-1, BPV-2 e BPV-13, causam proliferação de queratinócitos e fibroblastos gerando fibropapilomas benignos envolvendo o epitélio e a derme subjacente (Nasir e Campo, 2008; Lunardi et al., 2012).

O gênero *Xipapillomavirus* é composto pelo BPV-3, BPV-4, BPV-6, BPV-9, BPV-10, BPV-11 e BPV-12. Apresentam um genoma menor que os demais BPVs (7.3 Kb). Infectam queratinócitos causando papilomas que envolvem exclusivamente o epitélio sendo denominados “papilomas verdadeiros” (Hatama et al., 2008, 2011).

O gênero *Epsilonpapillomavirus* induz tanto os papilomas verdadeiros como fibropapilomas e a este gênero pertencem o BPV-5 e BPV-8 (Tomita et al., 2007).

O BPV-7 foi inicialmente denominado BAPV-6. Como sua sequência de nucleotídeos está mais próxima de PVs do gênero *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus* e *Pipapillomavirus*, que causam lesões de pele em humanos e na mucosa de hamsters, estes vírus permanecem em um gênero ainda não denominado (Ogawa et al., 2007).

Batista et al.,(2013) demonstraram, no entanto, que a morfologia, tipos e localização das lesões causadas pelos BPVs não atendem a classificação descrita anteriormente na literatura, tendo observado na presença de co-infecções de BPVs a associação de lesões do epitélio e fibropapilomas cutâneos.

O BPV-1 é o tipo mais pesquisado e tem sido amplamente utilizado como modelo de estudo para infecção e persistência do HPV, causa fibropapilomas localizados em áreas paragenitais como tetos, pênis e úbere em seu hospedeiro natural, os bovinos, e sarcóide em equinos. Sarcóide equino é uma neoplasia cutânea frequente em equídeos, de etiologia controversa e associado à ocorrência de BPV-1 e mais raramente BPV-2 nas lesões. Representa caso de infecção cruzada por PV e está associado à invasão pelos fibroblastos transformados do sarcóide, permitindo que essas células se infiltrem no tecido saudável circundante (Schiller et al., 1984; Yuan et al., 2010, 2011; Souza, 2013).

BPV-2 infecta o epitélio e a derme formando os fibropapilomas na pele, trato gastrointestinal e trato urinário. Estudos com bovinos relatam que a presença de BPV-2 associado a compostos químicos da samambaia induzem a HEB e câncer de bexiga (Borzacchiello et al., 2003, 2007). Infecções reprodutivas e abortos podem ocorrer, podendo também induzir fibropapilomas no esôfago e rumem. (Campo, 1994).

O BPV-3 foi isolado na Austrália de um papiloma epitelial de lesão de pele em 1979 e muito pouco é conhecido sobre sua historia natural. Os tumores induzidos pelo BPV-3 são caracterizados pela semelhança típica com tumores induzidos por BPV-4 e BPV-6 (Pfister et al., 1979; Campo, 2006).

BPV-4 foi caracterizado molecularmente em 1987 relacionado a bovinos com carcinoma de células escamosas oculares, papilomas esofágicos e tumores do trato digestivo associados ao consumo da samambaia (Ford et al., 1982; Patel et al., 1987; Borzacchiello et al., 2003).

BPV-5 pode infectar fibroblastos do epitélio e da derme induzindo fibropapilomas e papilomas epiteliais em bovinos. No úbere causam fibropapilomas como grãos de arroz (Bloch et al., 1994; Campo, 2006).

BPV-6 está relacionado à aparição de papilomas epiteliais planos no úbere de bovinos e foi descrito por Jarrett et al., (1984).

BPV-7 deve ser classificado em um novo gênero da família Papillomavirus devido a sua pouca semelhança com os três gêneros da família. Rector e Van Ranst, (2013) propuseram sua inclusão ao gênero *Dyoxipapillomavirus*, mas ainda não está confirmado. Foi isolado de um papiloma cutâneo e de pele íntegra de úbere, indicando a possibilidade de produzir infecção latente ou subclínica sem sintomas ou sinais clínicos (Ogawa et al., 2007).

BPV-8 foi inicialmente denominado BAPV-2, identificado no Japão em um caso de papilomatose cutânea e de um bison europeu nascido na Itália. O grau de similaridade observado entre a sequência de ORF L1 de BPV-8 e BPV-5, assim como os resultados da análise filogenética foram a base para classificá-lo no gênero *Epsilonpapillomavirus*, a única diferença entre eles foi na ORF E4 a qual estava presente para BPV-8 e ausente em BPV-5 (Tomita et al., 2007).

BPV-9 e BPV-10 foram identificados em papilomas e pele íntegra do teto de bovinos no Japão. A análise filogenética demonstrou a similaridade de 74,2% e 71,2% da ORF L1 de BPV-9 e BPV-10 em relação à BPV-3, respectivamente, permitindo a classificação dos dois novos tipos isolados no gênero *Xipapillomavirus* (Hatama et al., 2008).

Hatama et al.,(2011) avaliaram papilomas cutâneos no rebanho bovino japonês identificando três novos possíveis tipos de BPVs e caracterizaram um desses como o novo BPV-11 e a comparação da sequência de nucleotídeos do gene L1 permitiu sua classificação no gênero *Xipapillomavirus*.

A partir de amostra de lesão de língua coletada em bovino no Japão foi sequenciado o genoma de um novo tipo de BPV, este isolado foi denominado BPV-12 e a comparação da sequência de nucleotídeos do gene L1 do BPV-12 com outros isolados virais de bovinos, sugeriu sua classificação no gênero *Xipapillomavirus* (Zhu et al., 2012).

BPV-13 foi isolado de um papiloma cutâneo de uma vaca no sul do Brasil. A análise filogenética da sequência de nucleotídeos do gene L1 mostrou que o novo tipo pertence ao gênero *Deltapapillomavirus*. A proteína E7 do BPV-13 não contém o sítio de ligação para o supressor do tumor retinoblastoma, assim como identificado para BPV-1 e BPV-2, e a ORF E5 de BPV-13 codifica uma pequena proteína transformadora. A combinação desses dois diferentes aspectos biológicos foi reconhecida como uma marca distinta para o desenvolvimento do fibropapiloma e este mecanismo patogênico aparentemente ocorre apenas entre os delta-PVs (Narechania et al., 2004; Lunardi et al., 2012; 2013).

Embora estejam descritos atualmente 13 tipos de BPVs, supostos novos tipos vem sendo descritos na literatura utilizando análises filogenéticas de segmentos amplificados da ORF L1. 14 supostos novos tipos foram detectados em verrugas cutâneas e pele íntegra de bovinos, e outros estudos continuam em desenvolvimento (de Villiers et al., 2004; Hatama et al., 2004; Claus et al., 2007; Maeda et al., 2007).

Os BPVs estão distribuídos no rebanho bovino em todo o mundo e são responsáveis por causar lesões benignas que frequentemente regredem espontaneamente em 12 meses e afetam em sua maioria animais jovens e aqueles manejados de forma semi-intensiva e intensiva (Muro et al., 2008).

Algumas lesões podem persistir em animais com baixa imunidade ou submetidos a fatores estressantes, quando estas lesões podem se transformar em tumores malignos particularmente sob ação de co-fatores ambientais (Marins, 2004).

Nos bovinos, a infecção pelo BPV pode causar papilomatose cutânea, que ocorre em diversas áreas do corpo animal; papilomas e câncer no trato gastrointestinal e no trato urinário. Em animais alimentados com a samambaia (*Pteridium aquilinum*) o desenvolvimento do câncer no trato gastrointestinal e urinário é resultado da interação do vírus (BPV2 e BPV4 respectivamente) com agentes químicos, carcinogênicos e imunossupressores presentes na planta (Stocco dos Santos, et al., 1998; Tokarnia et al., 2000; Marins, 2004; Monteiro et al., 2008).

A Hematúria Enzoótica bovina (HEB) é uma enfermidade não infecciosa crônica, caracterizada pelo desenvolvimento de lesões na parede da bexiga urinária e clinicamente por hematúria intermitente que conduz à anemia, emagrecimento progressivo e morte (Blood e Radostits, 1989), tem sido observada em várias partes do mundo, do Brasil, e está associada ao BPV2 e à ingestão da planta *Pteridium aquilinum*, vulgarmente conhecida como samambaia. Tumores de bexiga são raros em bovinos criados fora das áreas de ocorrência da samambaia e da HEB (Marins, 2004; Tokarnia et al., 2000).

A HEB caracteriza-se por lesões hemorrágicas e hiperplásicas da mucosa vesical que, com frequência, evoluem para neoplasias (Durão et al., 1995). Campo et al. (1992) relataram que *P. aquilinum* possui vários princípios carcinogênicos, mutagênicos e imunossupressores, podendo causar diferentes neoplasmas na bexiga. Segundo Wosiacki (2002; 2006) há uma progressão nas lesões da bexiga em relação à malignidade a partir de inter-relações entre o papilomavírus e os compostos químicos da samambaia.

A infecção no trato gastrointestinal superior causada por infecções pelo BPV-4 pode se estender da boca e língua ao esôfago, rumem e retículo, induzindo conseqüentemente dificuldades na alimentação e respiração que podem levar a óbito (Campo, 1997; Dong et al., 2013). Em animais imunocompetentes o sistema imune pode levar à regressão desses papilomas, no entanto, bovinos que se alimentam da samambaia apresentam papilomas persistentes que podem se transformar em carcinoma (Knowles et al., 1996; Campo et al., 1994; Borzacchiello et al., 2003; Masuda et al., 2011).

2.5 Papilomatose Cutânea Bovina

A papilomatose cutânea bovina tem caráter tumoral benigno, infecto-contagioso, caracterizada por alterações na pele, causadas pelos papilomavírus que infectam as células basais do epitélio ou os fibroblastos, formando projeções digitiformes microscópicas ou macroscópicas (Silva et al., 2004; Monteiro et al., 2008).

O BPV é adquirido diretamente por inoculação cutânea (Stringfellow et al., 1988) ou através de soluções de continuidade da pele (Wosiacki, 2002). A contaminação pode ocorrer por contato direto entre animais infectados ou de forma indireta através de bebedouros, cochos, cercas, agulhas, ordenhadeiras e mãos contaminadas de tratadores (Yagui et al., 2006, Souza, 2013).

A infecção pelo BPV ocorre a partir de uma microlesão tecidual expondo peptídeoglicanos de sulfato de heparina que compõem a membrana plasmática. A proteína L1 do BPV se liga ao sulfato de heparina gera uma mudança de conformação expondo a proteína L2, que é clivada pela furina o que resulta em outra alteração estrutural e permite a ligação do vírus a integrina alfa 6 de modo que as partículas virais são internalizadas por endocitose cerca de 2-4 horas após a ligação do vírus a superfície da membrana celular (Hart et al 2011; McBride et al., 2012; Araldi, et al., 2014).

Recentemente, estudos têm mostrado outras moléculas como participantes da infecção celular, sendo elas a laminina 5 ou 332, $\alpha 6$ integrina (CD49f) e fatores de crescimento. A laminina 5 é uma integrina sintetizada por queratinócitos basais (Yagui et al., 2006; Florin et al., 2012).

A infecção pelo papilomavírus se inicia na camada basal do epitélio, nas células indiferenciadas, onde o genoma viral se mantém em baixo número de cópias e epissomal (Campo, 1995; McBride et al., 2012; Moody e Laimins, 2010). Após a infecção celular, o ciclo reprodutivo do BPV se dá com (1) a formação de genomas virais em baixo número de cópias, (2) a manutenção da replicação e (3) amplificação vegetativa de células diferenciadas (McBride et al., 2012). Assim sendo, o vírus só completa seu ciclo reprodutivo por meio de uma diferenciação concomitante das células epiteliais, o que resulta na ineficiência da propagação dos vírions em cultura de tecidos (Shafiti-Keramati et al., 2003, White e Howley, 2013).

A presença de BPVs em diferentes tecidos e fluidos corpóreos como sangue, plasma, leite, colostro, placenta, líquido amniótico, gametas e órgãos reprodutivos, sugere outros meios de infecção como o acasalamento e a possibilidade de transmissão vertical (Stocco et al., 1998; Yagui et al., 2006; Freitas et al., 2007; Lindsey et al., 2009; Roperto et al., 2012; Santos et al., 2014).

Embora haja necessidade de estudos mais aprofundados, a transmissão vertical, tanto através da monta natural quanto da inseminação artificial, chama atenção para o comprometimento reprodutivo dos animais, por representar um mecanismo rápido de disseminação da doença e alerta quanto à necessidade de controle sanitário de doadores de sêmen e embrião, observando condições sanitárias dos rebanhos quanto à fertilização *in vitro* (Silva et al., 2011).

A transmissão através de vetores como insetos e artrópodes também está relatada. As moscas atuam como transmissores mecânicos tanto por contato, carreando o vírus de um animal infectado a outro ao pousar em áreas contaminadas, quanto por inoculação ao fazer repasto sanguíneo. De forma semelhante os carrapatos ao introduzirem o aparelho bucal nos animais poderiam atuar como vetores (Correa e Correa, 1992; Finlay et al., 2009; Catroxo et al., 2013).

BPVs também são encontrados na pele íntegra de animais aparentemente saudáveis, sem sinais ou sintomas da doença mostrando a pele como sítio de latência do vírus (Borzacchiello et al., 2003). Leucócitos circulantes também abrigam BPVs na forma epissomal sendo considerado outro sítio de latência (Borzacchiello e Roperto, 2008).

O reservatório da doença são os próprios doentes, especialmente porque a papilomatose cutânea tem curso prolongado. O BPV pode estabelecer uma infecção latente em que o animal fica portador, sendo reservatório natural e principal fonte de transmissão (Campo, 1995, Murphy et al., 1999, Ogawa et al., 2004, Campo, 2006).

Os vírus em infecção latente permanecem no epitélio normal e podem, na ocorrência de traumas que lesem o epitélio infectado ou quando submetidos a fatores imunossupressores como temperaturas extremas, sede, alimentação inadequada, acometimento por outras doenças, levar à formação de papilomas nos animais aparentemente saudáveis, através da reativação do vírus que induz a proliferação celular devido à expressão dos seus genes (Campo, et al., 1994; Ogawa et al., 2004).

A infecção está intimamente relacionada com a competência imunológica individual, por isso condições estressantes podem levar a uma baixa da imunidade facilitando o aparecimento da doença (Silva et al., 2004).

Geralmente os papilomas aparecem na superfície do corpo dos animais em média aos 2 anos de idade e observam-se os sinais clínicos dentro de 1-6 meses após a inoculação do vírus (Campo, 2002). O período de incubação é bastante variável e está intimamente relacionado com a competência imunológica individual (Silva et al., 2004). BPVs são muito resistentes aos agentes externos, somente sendo inativados à 70°C e oscilações de pH e éter não possuem efeito inativador (Beer, 1999).

As lesões de pele podem ser causadas por pelo menos 13 diferentes tipos de BPV, podem se espalhar por todo corpo do animal e se caracterizam histologicamente como proliferação epitelial benigna ou proliferação epitelial e dermatológica benigna (Silvestre et al., 2009; Pangty et al., 2010; Bocaneti et al., 2014).

Estudos da epidemiologia molecular dos BPVs têm correlacionado a identificação do vírus com o tropismo por tecidos e lesões específicas. Como resultado BPV-1 tem sido relatado nos tetos, pênis e fibropapilomas cutâneos, BPV-2 em verrugas de pele e fibropapilomas no trato gastrointestinal, BPV-3 em papilomas de pele, BPV-4 em papilomas epiteliais do trato gastrointestinal e da pele, BPV-5 em fibropapilomas da bexiga, BPV-6 em papilomas de tetos, BPV-7 e BPV-8 em verrugas cutâneas, BPV-9 e BPV-10 em papilomas do epitélio escamoso dos tetos, BPV-11 em fibropapilomas dos tetos e BPV-13 em papilomas cutâneos na orelha (Ogawa et al., 2007, Borzacchiello e Roperto, 2008, Hatama et al., 2011, Lunardi et al., 2012, Batista et al., 2013, Bocaneti et al., 2013).

Estudos recentes, porém, citam a presença de vários tipos de BPVs simultaneamente em uma mesma lesão (Schmitt et al., 2010, Carvalho et al., 2012, Batista et al., 2013). A importância destes achados está relacionada ao desenvolvimento de vacina contra o BPV que requer o desenvolvimento de produtos que apresentem um espectro de cobertura para mais de um tipo viral, já que pesquisas anteriores mostram que a imunidade induzida por BPV é tipo-específica (Nicholls e Stanley, 2000, Claus et al., 2007).

Quanto à localização e características histopatológicas das lesões as verrugas são observadas topograficamente em regiões específicas e apresentam características macroscópicas e histológicas particulares (Monteiro et al., 2008).

Os papilomas podem se apresentar de formas variadas como típicos (com aspecto semelhante ao de uma couve-flor, tendo base de inserção ampla ou estreita, o que atribui aspecto pedunculado, bastante firme, às vezes duro como unhas e chifres), atípicos (com aspecto achatado, plano, com lesões circulares, base ampla, sem pedículos), atípicos engastados (com formação globosa encapsulada, bem delimitada e profunda) e papilomas filamentosos de úbere com implantação basal fina, superfície extremamente queratinizada, plumoso ou de “grão de arroz”, conferindo aspecto fibroso (Campo, 2002, Monteiro et al., 2008, Araldi, 2014).

As lesões podem apresentar-se verrugosas, com massas protusas, firmes, de coloração branca acinzentada ou bronze, com superfície seca e cornificada, com dimensões que variam desde 1mm até 500mm. Quanto à localização, aparecem mais comumente na cabeça, pescoço, barbel, tronco, membros, úbere, teta e pênis, locais onde os animais sofrem mais atrito e pequenas contusões (Monteiro et al., 2008).

Algumas lesões são acinzentadas e mais planas, possuindo fixação cutânea da base larga ou pedunculada. Os tumores são constituídos por tecido epitelial e conjuntivo, com aspecto bulboso ou de “couve-flor”, frondoso, plumoso ou de “grão de arroz” (William et al., 1992).

A regressão das lesões ocorre devido à imunidade celular efetuada através de células T, mais precisamente CD4 e CD8 e através da imunidade humoral, prevenindo contra novas infecções, entretanto esta imunidade é espécie específica e os animais podem sofrer infecções sucessivas através de tipos virais diferentes, apesar do desenvolvimento imunológico para infecções prévias (Knowles et al., 1996).

O animal acometido pelo BPV pode apresentar complicações como hemorragias, infecções secundárias e feridas mecânicas que ocorrem devido ao atrito dos papilomas grandes ou aglomeradas, e podem levar a transtornos gerais tóxicos e até a septicemia (Melo e Leite, 2003; Silva, 2004b). A presença de verrugas no úbere de vacas em lactação torna o animal susceptível a invasores secundários e o desvaloriza zootecnicamente (Wadhwa et al., 1995).

A papilomatose cutânea causa morbidade elevada, havendo diferença em relação ao tipo de manejo (populações confinadas são mais susceptíveis aos surtos, como os bovinos utilizados na pecuária leiteira), idade do rebanho (os mais jovens são mais susceptíveis) e alguns estudos citam raças (taurinas apresentam maior prevalência, os animais da raça Holandesa variedade preto e branco, apresentam maior ocorrência) (Silva et al., 2005).

A letalidade é baixa. Em alguns casos os animais vêm a óbito quando o número de papilomas é elevado e estão situados em áreas como boca, esôfago e partes do trato respiratório superior, dificultando ou impedindo a alimentação e respiração do animal ou na presença de co-fatores ambientais levando as lesões à malignidade (Lunardi et al., 2013).

Há várias formas de identificação do BPV nos tecidos animais e estas variam segundo a sensibilidade e especificidade. As técnicas diagnósticas incluem exame clínico, histopatológico e detecção de sequência de DNA viral através de técnicas como Southern blot, dot blot, reverse blot, hibridização *in situ* e imunohistoquímica (Elzein et al., 1991, Monteiro, 2008, Leto et al., 2011, Betiol et al., 2012, Araldi et al., 2014).

Os primeiros diagnósticos de infecções foram baseados nos achados histológicos das lesões e em alterações da morfologia celular (Souza et al., 2013, Wosiacki et al., 2005). Entretanto a *polymerase chain reaction* (PCR) tem demonstrado ser o método mais sensível para identificação e caracterização de BPV através do uso de primers degenerados seguido de purificação do DNA e análise de similaridade das sequências em programas de computador e busca em bancos de dados como Blast (Carvalho et al., 2012, Nascimento et al., 2012, Zhu et al., 2012).

A avaliação do tratamento contra papilomatose cutânea é relativa por ser uma enfermidade autolimitante e que pode regredir de acordo com a condição imune de cada animal (Veiga et al., 2000).

Na presença de poucos papilomas em alguns animais acometidos, o procedimento indicado é cirúrgico, pois os tumores normalmente não recidivam. No entanto, papilomas costumam ser numerosos e acometem grande parte do rebanho o que exclui a praticabilidade da cirurgia, desta forma, numerosos tratamentos sistêmicos têm sido preconizados (Marins, 2004).

Há tratamentos de fundo religioso, crenças e simpatias; químico-corrosivos, fitoterápicos, empírico-científicos e imunoterápicos. Nenhum deles é específico e não apresentam resultados constantes, justificando o surgimento de novos tratamentos (Correa e Correa, 1992).

Os químicos-corrosivos utilizam a cauterização com bastão de soda, ácido sulfúrico, nitrato de prata, entre outros, e podem causar reabsorção de tecidos ricos em vírus e animais imunocompetentes podem vir a curar-se secundariamente ao estímulo desencadeado (Correa e Correa, 1992).

Entre os compostos químicos usados, clorobutanol e diaceturato de diaminazina administrado semanal ou quinzenalmente apresentam resultados significativos. Levamisole estimula a produção de mediadores da imunidade celular e ativa a população de linfócitos T e a ivermectina estimula o sistema imunomediado e apresenta efeito anti-tumorigênico (Correa e Correa, 1992; Santin, 2001).

Entre os empíricos-científicos utiliza-se amarrar uma verruga pediculada com crina de cavalo ou com fio de seda para causar gangrena seca e reabsorção do coto e pendurar fio de cobre em volta do pescoço do animal acometido (Correa e Correa, 1992).

A fitoterapia utiliza plantas medicinais para o tratamento da enfermidade e dentre elas a *Genipa americana* (Jenipapo), a *Thuya occidentalis*, e a *Euphorbia tirucallis* (aveloz) apresentam efeitos promissores contra alguns tipos de tumor. A *Thuya occidentalis* tem sido empregada no tratamento da papilomatose cutânea bovina apresentando resultados positivos (Marins, 2004; Monteiro et al., 2008).

Em relação à imunoterapia, há a auto-hemoterapia, vacina autógena e vacinas de vírus purificados. As vacinas autógenas são preparadas com tecidos dos papilomas do próprio rebanho que será imunizado. Tem caráter curativo e evita-se o tratamento preventivo com este produto biológico (Correa e Correa, 1992, Hama et al., 1988, Muro et al., 2008).

A auto-hemoterapia utiliza sangue venoso, com ou sem anticoagulante, de animal acometido aplicando imediatamente após a retirada via intramuscular profunda ou subcutânea no próprio animal. Baseia-se na tentativa de desencadear um estímulo imunológico de defesa do organismo do animal, levando a eliminação das lesões (Correa e Correa, 1992, Santin et al., 2004, Muro et al., 2008, Souza, 2013).

As primeiras vacinas para BPV foram baseadas em extratos obtidos de macerados de verrugas e mais tarde de vírus purificados (Jarrett et al., 1991). Dentre as diferentes possibilidades de vacinação encontram-se vacinas de vírus purificados, proteínas recombinantes expressas e vacinas baseadas em VLPs (Virus Like Particles) (Campo, 1993).

A imunidade contra BPV é considerada tipo-específica e o status imune do animal infectado é considerado fator crucial para a progressão clínica da doença. Enquanto a imunidade humoral previne contra novas infecções, a imunidade celular está associada à regressão espontânea e imunomediada das lesões (Nichols e Stanley, 2000).

As vacinas terapêuticas são baseadas na indução de imunidade celular contra células expressando antígenos virais, visando à regressão de lesões. As proteínas não estruturais são alvos da maioria dessas vacinas já que são proteínas expressas em células de tumores associados ao BPV (Campo, 1997).

As VLPs de L1 constituem uma alternativa para produção de vacinas profiláticas sendo capazes de induzir a formação de anticorpos neutralizantes sistêmicos e de mucosas além de induzir imunidade celular em animais imunizados (Liu et al., 1998).

A resposta imune à infecção por BPV é pobre, provavelmente devido ao ciclo de vida restrito do vírus que não entra em contato com o sistema imune do hospedeiro. Vacinas tradicionais produzidas a partir de vírus mortos ou atenuados de cultura celular não são possíveis, sendo utilizados outros sistemas para produção de vacinas baseadas nas proteínas L1 e L2 (Campo, 1997; Lunardi et al., 2013).

O desenvolvimento de vacinas profiláticas e/ou terapêuticas para BPVs continua sendo um desafio para os cientistas (Bocanetti et al., 2014). A ocorrência de co-infecção por múltiplos tipos virais demanda a produção de vacinas de amplo espectro de cobertura, entretanto não há estudos epidemiológicos capazes de identificar os tipos virais mais recorrentes no Brasil, e no mundo (Campo, 1996; Nichols e Stanley, 2000; Carvalho et al., 2012; Araldi, 2014).

Os tratamentos citados demonstram resultados favoráveis, porém não são reproduzíveis. A grande maioria revela-se dispendiosa, insatisfatória e, frequentemente, com ocorrência de recidiva, levando o produtor a descartar precocemente animais de alto valor zootécnico, o que tem gerado uma busca de novos protocolos de tratamento menos dispendiosos, mais seguros e eficazes (Correa e Correa, 1992, Santin et al., 2004). Neste contexto surge a homeopatia.

Ciência terapêutica baseada na lei natural de cura *Similia similibus curenter* (semelhantes curados pelos semelhantes), a homeopatia tem sido utilizada com sucesso (Rodríguez et al., 2005, Monteiro et al., 2008) por suas características de eficácia, segurança, ausência de resíduos inócuos à saúde humana, animal e vegetal (Arenales, 2002).

Na prática médica homeopática é comum e difundido o uso de alguns medicamentos que possuem a capacidade específica de promover o desaparecimento de verrugas. As ações parecem estar relacionadas à estimulação e purificação do sangue, sendo utilizados no desaparecimento de verrugas, condilomas e papilomas em geral (Offergeld et al., 1992, Arenales, 2002).

2.6 Homeopatia

A homeopatia surgiu como nova abordagem terapêutica há mais de dois séculos, baseada no princípio dos semelhantes curam semelhantes “*Similia similibus cutantur*”, postulado por Hipócrates, e desenvolvida pelo médico alemão Friedrich Samuel Hahnemann (Pereira, 2012)

Hahnemann nasceu em Meissen, aos 12 anos cursou humanidades, aos 14 ministrava aulas de grego e aos 20 finalizou seu curso de medicina da Universidade de Leipzig na Alemanha. Dominava vários idiomas como inglês, francês, espanhol, sírio, latim, grego, árabe, hebreu e caldeu. Para se sustentar lecionava línguas estrangeiras e traduzia livros para o alemão (Mitidieiro, 2002). Tornou-se um clínico de renome, próspero e com boa clientela. Publicou documentos na área de química e medicina (Coelho, 2010).

Este aspecto de sua vida foi decisivo em seu futuro, pois lhe permitiu ler várias obras em grego e latim de autores clássicos e modernos. Leu os livros de Hipócrates tomando conhecimento pela primeira vez do princípio de tratamento “*Similia similibus curantur*”, estudou patologias e doenças, pesquisou sobre as correntes filosóficas da época, o materialismo e o vitalismo (Marinho, 2008).

Por não se conformar com a imprecisão dos meios utilizados para tratamento dos doentes, fez críticas à medicina de sua época que era baseada em sangrias, substâncias tóxicas, laxativas, catárticas e enemas, e resolveu abandonar a clínica médica, passando a viver de traduções de livros para a língua alemã (Mitidieiro, 2002, Marinho, 2008).

Traduzindo a matéria médica de William Cullen, médico francês, em 1790, livro em que o autor descrevia as principais substâncias em uso na prática clínica e tentava explicar seu mecanismo de ação, Hahnemann começa seu questionamento por não concordar com o autor ao afirmar que a quina (*Chinchona officinalis*) curava a malária por ser adstringente e amarga, já que outras drogas mais adstringentes e amargas não atuavam nesta doença (Mitidieiro, 2002; Pereira, 2012).

Decidiu experimentar em si mesmo, ingerindo a quina diariamente, nas doses recomendadas na época e para sua surpresa passou a apresentar uma série de sintomas típicos da malária. Ao suspender o uso, os sintomas desapareceram e sua saúde voltou ao normal. Considerou então, haver uma identidade entre a droga e a doença, uma vez que a droga eficiente no tratamento da malária era capaz de produzir sintomas semelhantes aos desta enfermidade. Ressurgiu para Hahnemann os ensinamentos de Hipócrates sobre os princípios da cura pelos semelhantes (Marinho, 2008).

Como havia traduzido o livro do fisiologista Albrecht Von Haller que preconizava a necessidade de estudar a ação de medicamentos em homens sadios antes da prescrição aos doentes, repetiu a experimentação com a quina e passou a testar outros medicamentos utilizados na época, em si, em parentes e amigos, compilando todos os sinais e sintomas produzidos pelas substâncias testadas (Kossak-Romanach, 1994; Dantas, 1989).

A partir da compilação dos sintomas, passou então a fazer prescrições a pacientes que apresentavam sintomas semelhantes aos produzidos pelos medicamentos no homem são e observar se havia cura. Diante dos resultados obtidos, Hahnemann pode confirmar sua hipótese e em 1796 publicou no *Jornal de Medicina Prática*, principal revista médica alemã da época, seu primeiro trabalho relatando sua descoberta e marcando o nascimento da homeopatia (Kossak-Romanach, 1994).

Desenvolveu muitos estudos posteriores com a ajuda de discípulos e catalogou com detalhes a ação farmacodinâmica e curativa das drogas testadas, dando origem a matéria médica homeopática. Em seu livro “*Organon da Arte de Curar*” expôs toda a sua teoria e método terapêutico representando a doutrina homeopática, seus ensinamentos e regras minuciosas (Marinho, 2008).

A partir daí Hahnemann passa a difundir sua teoria através de conferências levando sua doutrina para os alunos de medicina da Universidade de Leipzig e estes médicos difundem a obra do autor atraindo a atenção de clínicos e pacientes de vários países (Fontes, 2001).

2.6.1 Princípios Básicos da Homeopatia

Na homeopatia admite-se a existência de uma “força organizadora“ que ajuda a manter os organismos vivos em estado saudável, chamada Força ou Princípio Vital. O sistema imune do corpo físico relaciona-se intrinsecamente com a força vital, esta energia flui através do corpo e controla suas funções (Demers, 2007).

O equilíbrio da energia vital representa o estado de saúde e reflete na integridade dos órgãos e regularidades das funções, costumes e comportamentos adequados dos animais de acordo com sua espécie. Desta forma, sob a perspectiva vitalista, a saúde representa a energia a fluir no corpo controlando as suas funções vitais de forma dinâmica e harmoniosa, que, ao ser desequilibrada implica no aparecimento da doença (Kossak-Romanach, 2003).

Para Hahnemann, a doença seria uma alteração do equilíbrio vital que precede a instalação do processo patológico e possibilita o desenvolvimento da alteração orgânica. A doença surge então a partir da invasão por um elemento específico combinada com a predisposição do indivíduo (Pereira, 2012).

A partir do entendimento da Força Vital, Hahnemann propõe em seu “Organon da Arte de Curar” os ensinamentos básicos conhecidos como Pilares da Homeopatia (Marinho, 2008):

(1) **Lei dos Semelhantes:** sobre a qual se baseia a homeopatia e determina que a doença é curada por substância capaz de reproduzir os mesmos sintomas da doença em homem sadio.

(2) **Experimentação no Homem Sadio (Patogenesia):** demonstrou que um homem sadio ao tomar determinada substância por algum tempo, desenvolvia sintomas que não apresentava antes e estes sintomas assemelhavam-se a relatos de uma doença artificial.

(3) **Doses Mínimas (Medicamento diluído, atenuado e dinamizado):** é o processo de preparação de medicamentos baseado em diluições infinitesimais da substância e capazes de potencializar seus efeitos. No início Hahnemann diluía as substâncias para reduzir sua toxicidade, entretanto como, muitas vezes, algumas substâncias não dissolviam, ele agitava os frascos para solubilizar as partículas, adicionando energia cinética as mesmas por meio de sucuções. Denominou este processo de dinamização e observou que quanto mais diluía e agitava mais potente ficava o medicamento e se obtinha melhores resultados de cura

(4) **Medicamento Único:** Hahnemann administrava um medicamento por vez para impedir as interações medicamentosas e argumentava que durante a experimentação patogénica não se experimentam várias drogas ao mesmo tempo.

Atualmente existem várias correntes homeopáticas. A Escola Unicista que prescreve um único medicamento tentando cobrir o máximo de sintomas possíveis, a Escola Organicista que prescreve medicamento pelos sintomas das doenças detectando possíveis distúrbios do órgão afetado e também procura estabelecer uma associação entre o medicamento e sua atuação a nível mental, Escola Alternista ou Pluralista que prescreve um ou mais medicamentos complementares para cada sintoma ou doença e os medicamentos são ingeridos um de cada vez em horários alternados e a Escola Complexista que prescreve vários medicamentos com indicação específica para doença e sintoma, sendo os mesmos ministrados juntos (Mitidieiro, 2002).

As substâncias que dão origem aos medicamentos homeopáticos podem pertencer ao reino animal, vegetal ou mineral, podem ter origem em substâncias industrializadas, substâncias de laboratórios biológicos e de materiais fisiológicos e patológicos, os denominados nosódios ou bioterápicos (Benez, 2001).

A preparação do medicamento homeopático obedece a normas precisas e definidas pela farmacopeia homeopática a partir das orientações básicas enunciadas por Hahnemann no Organon. No Brasil a Farmacopeia Homeopática Brasileira foi oficializada pelo governo federal através do decreto N°. 78.841 de 25.11.76 (Brasil, 2011).

A farmacotécnica homeopática emprega três escalas de acordo com a proporção entre a substância ativa e inerte (água ou álcool): a decimal, a centesimal e a cinquenta milesimal.

Na escala decimal a diluição é preparada na proporção de 1/10, ou seja, uma parte da substância ativa para nove partes da substância inerte, compondo um total de dez partes. Essa escala foi criada por Constantine Hering médico homeopata e utiliza como símbolo a letra X (dez em algarismo romano) D ou DH (decimal de Hering) (Dantas, 1989; Nassif, 1997; Benez, 2001; Mitidieiro, 2002).

Na escala centesimal a diluição é preparada na proporção de 1/100, ou seja, uma parte da substância ativa para noventa e nove partes da substância inerte, compondo um total de cem partes. Essa escala foi criada por Hahnemann e utiliza como símbolo a letra C, nenhuma indicação, CH (centesimal Hahnemanniana) ou o símbolo “^a” (Fontes, 2005).

Na escala cinquenta milesimal a diluição é preparada na proporção de 1/50000 e seus símbolos são Q ou LM. A potência do medicamento é o resultado final de cada etapa do processo de dinamização. A partir da diluição 24 DH e 12 CH não é possível detectar átomos ou moléculas da substância original uma vez que se ultrapassa o número de avogrado ($6,02 \times 10^{23}$) e o medicamento deixa de ter qualquer elemento que deu origem a tintura mãe (César, 2003).

A energia gerada na dinamização do medicamento consegue despertar na substância a capacidade de agir sobre a força vital do organismo vivo. O estímulo do medicamento homeopático produz uma patogenesia que, quando semelhante à manifestação da doença, provoca no organismo uma reação de estímulo capaz de reativar as células do sistema imune, tornando-o capaz de reequilibrar a força vital. No entanto é necessário avaliar a intensidade deste estímulo que deverá ser proporcional à condição do paciente evitando-se uma resposta humoral exagerada que a supere (Benites, 1996; Marinho, 2008).

Desta forma a escolha da potência do medicamento a ser administrado, deve ser diretamente proporcional à capacidade do organismo de suportar a agravação homeopática que é uma resposta do organismo em reação à enfermidade, o caminho em direção a cura (Marinho, 2008).

Portanto, quem promove a cura não é a ação direta do remédio sobre a patologia, mas sim, a ação do medicamento na energia vital que se encontra desequilibrada e ao restaurar o equilíbrio energético permite que o próprio organismo combata a doença (Seleghini, 2007).

2.7 Isoterapia e Bioterápicos

Johann Joseph Wilhelm Lux nasceu em 1777 em Oppeln na Alemanha, médico veterinário e contemporâneo de Hahnemann utilizou a homeopatia e criou um novo sistema terapêutico, a isoterapia, que consiste no método de tratamento através dos iguais (*Aequalia aequalibus curantur*). A isoterapia tem por base o princípio “igual cura igual” e independente da natureza da substância empregada esta é utilizada como matéria prima para preparação do medicamento de forma dinamizada e diluída segundo o método prescrito por Hahnemann (Coelho, 2010).

O termo isopatia é originário do grego (iso = igual e pathos = doença) e se refere à prática terapêutica que consiste em administrar a um indivíduo, com fins curativos, o mesmo agente causal da enfermidade que se pretende curar, produzido de acordo a farmacopeia homeopática. Em outras palavras, a isopatia é o método de curar as doenças por intermédio dos agentes causais (Sampaio, 1995; Costa, 1998).

Em seu trabalho publicado “Isopatia de las enfermedades contagiosas”, Lux demonstra o tratamento da peste bovina a partir da secreção nasal de animais infectados e o tratamento do carbúnculo a partir de sangue de animais infectados dinamizados na potência 30 CH (Benez, 2001).

Segundo a classificação da Farmacopeia **os Isoterápicos (Bioterápicos)** são preparações medicamentosas obtidas a partir de insumos relacionados com a patologia do paciente, sendo classificadas como autoisoterápicos e heteroisoterápicos. Os autoisoterápicos utilizam insumos obtidos do próprio paciente e os heteroisoterápicos utilizam insumos externos ao paciente que de alguma forma o sensibilizam (Brasil, 2011).

Segundo a 3ª edição da Farmacopeia Homeopática Brasileira os bioterápicos são preparações medicamentosas a partir de produtos biológicos, quimicamente indefinidos: secreções, excreções, tecidos, órgãos, produtos de origem microbiana e alergenicos. Essas preparações podem ser de origem patológica (nosódios) ou não patológicas (sarcódios). Os

bioterápicos de estoque são produtos cujo insumo ativo é constituído por amostras preparadas e fornecidas por laboratórios especializados (Brasil, 2011).

Podem utilizar a escala decimal, centesimal ou cinquenta milesimal e os autoisoterápicos só podem ser estocados em etanol 77% (v/v) ou superior e dispensados a partir da diluição 12 CH ou 24 DH (Brasil, 2011).

Há uma discussão se os bioterápicos são medicamentos homeopáticos, pois de forma geral não têm experimentação no homem são. Os franceses os consideram medicamentos homeopáticos por serem fundamentados numa lei análoga à homeopatia (Lei do Equalia), por serem dinamizados, dependerem de uma reação própria do organismo ao qual são administrados e serem eficazes sem serem tóxicos. Podem ser aplicados com aspectos curativos e preventivos já que podem utilizar o agente etiológico da doença que se pretende combater (Nassif, 1997).

Diversos experimentos têm sido conduzidos em animais utilizando bioterápicos para tratamento de doenças na medicina veterinária e sua indicação está principalmente relacionada a patologias em que inexistem tratamento alopático satisfatório ou vacina, na impossibilidade de uso de produtos alopáticos como no manejo orgânico e na ineficiência do tratamento com medicamentos homeopáticos (Silva, 2005).

3. REFERÊNCIAS

ARALDI R. P., CARVALHO, R. F., MELO, T. C., DINIZ, N. S. P., SANT'ANA, T. A., MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J., SPADACCI-MORENA, D. D., BEÇAK, W., STOCCO, R. C. Bovine Papillomavirus in the beef cattle: first description of BPV-12 and putative type BAPV8 in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.13, n.3, p. 5644-5653, 2014.

ARALDI R. P., MELO, T. C., DINIZ, N. S. P., CARVALHO, R. F., BEÇAK, W., STOCCO, R. C. Bovine Papillomavirus clastogenic effect analyzed in comet assay. **Biomed Res. Int.**, p.1-7, 2013.

ARENALES, M. C. Homeopatia em gado de corte. In: Conferência virtual Global sobre orgânica de bovinos de corte, São Paulo. **Anais...São Paulo**, v.1, 2002.

BASTIDE, M., LAGACHE, A., LEMAIRE-MISONNE, C. Le paradigme des signifiants: schème d'information applicable à l'Immunologie et à l'Homéopathie. **Rev Int Systémique**, v. 9, p. 237-249, 1995.

BATISTA, M.V., SILVA, M.A., PONTES, N.E., REIS, M.C., CORTEGGIO, A., CASTRO, R.S., BORZACCHIELLO, G., BALBINO, V.Q., FREITAS, A.C. Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. **Vet. J.** 197, 368-373, 2013.

BATISTA, M. V., FERREIRA, T. A., FREITAS, A. C., BALBINO, V. Q. An entropy-based approach for the identification of phylogenetically informative genomic regions of Papillomavirus. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 8, p. 2026-2033, 2011.

BENEZ, S. M. **Homeopatia: 100 segredos**. 2.ed. São Paulo: Robe, 2001.

Benites, N.R. **Doenças agudas: aspectos imunológicos e patológicos e sua relação com a escolha do medicamento homeopático e modo de administração**. Monografia (Especialização) - APH, São Paulo, 1996.

BERNARD HU, BURK RD, CHEN Z, VAN DOORSLAER K, HAUSEN H, DE VILLIERS E.M. Classification of Papillomaviruses (PVs) Based on 189 PV Types and Proposal of Taxonomic Amendments. **Virology**, v.401, p.70-79, 2010.

BETIOL, J. C., KIGNEL, S., TRISTÃO, W., ARRUDA, A. C., SANTOS, S. K. S., BARBIERI, R., BETTINI, J. D. S. R. HPV 18 prevalence in oral mucosa diagnosed with verrucous leukoplakia: cytological and molecular analysis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 65, n. 8, p. 769-770, 2012.

BLOCH, N., BREEN, M., SPRADBROW, P.B. Genomic sequences of bovine papillomaviruses in formalin-fixed sarcoids from Australian horses revealed by polymerase chain reaction. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.41, n.1-2, p.163-172, jul. 1994.

BLOOD, D. C., RADOSTITS, O. M., HENDERSON, J. A. **Diseases caused by viruses and Chlamydia, II: Papillomatosis**. Veterinary Medicine. 6ed., London: Bailliere Tindall, p. 838-840, 1983.

- BOCANETI, F., ALTAMURA, G., CORTEGGIO, A., MARTANO, M., ROPERTO, F., VELESCU, E., BORZACCHIELLO, G. Expression of platelet derived growth factor beta receptor, its activation and downstream signals in bovine cutaneous fibropapillomas. **Res. Vet. Sci.** 94, 596–601, 2013.
- BOCANETI, F., ALTAMURA, G., CORTEGGIO, A., VELESCU, E., ROPERTO, F., BORZACCHIELLO, G. Bovine Papillomavirus: New Insights into na Old Disease. *Transboundary Emerging Diseases*, v.1, p.1-10, 2014. <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12222>.
- BORZACCHIELLO, G., AMBROSIO, V., ROPERTO, S., POGGIALI, F., TSIRIMONAKIS, E., VENUTI, A., CAMPO, M.S., ROPERTO, F. Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the South of Italy. **J. Comp. Pathol.**, v.128, p. 203-206, 2003.
- BORZACCHIELLO, G., RUSSO, V., SPOLETO, C., ROPERTO, S., BALCOS, L., RIZZO, C. Bovine papillomavirus type-2 DNA and expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular tumours of the urinary bladder in cattle. **Cancer Lett.** v. 250, p. 82–91, 2007.
- BORZACCHIELLO, G., ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research** v.1, p. 39-45, 2008.
- BORZACCHIELLO, G., ROPERTO, F., NASIR, L., CAMPO, M. S. Human papillomavirus research: do we still need animal models? **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 3, p. 739-740, 2009.
- BRASIL AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Farmacopéia Homeopática Brasileira**, Ministério da Saúde, 3ed, 2011.
- CAMPO, M. S., Papillomavirus and disease in humans and animals. **Vet. Comp. Oncol.**, v.1, p. 3–14, 2003.
- CAMPO, M.S. Animal model of papillomavirus pathogenesis. **Virus Res.** v. 89, p. 249–261, 2002.
- CAMPO M.S. Bovine Papillomavirus: Old System, New Lessons? In: Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccine and Beyond (Campo MS, ed.). **Caister Academic Press**, Scotland, p.373-383, 2006
- CAMPO, M.S., JARRETT, W.F., BARRON, R.J, O'NEIL, B.W., SMITH K.T. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. **Cancer Res.**, v. 52, p.6898–6904, 1992.
- CAMPO, M.S., GRINDLAY, G.J., ONEIL, B.W., CHANDRACHUD, L.M., MCGARVIE, G.M., JARRETT W.F.H. Prophylactic and Therapeutic Vaccination against a Mucosal Papillomavirus. **Journal of General Virology**, v.74, p. 945-953, 1993.
- CAMPO, M.S., JARRETT, W.F., O'NEIL, B.W., BARRON, R.J. Latent papillomavirus infection in cattle. **Res.Vet. Sci.**, v. 56, p. 151–157, 1994.

CAMPO M.S. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. **Trends in Microbiol.**, v.3, p. 92-97, 1995.

CAMPO, M.S. Papillomavirus and cancer. **Vet J.**, v. 154, p. 175–188, 1997.

CARRAZZONI, P. G., TENÓRIO FILHO, F., COELHO, M. C. C. Transferência de Imunidade Passiva (TIP) em bezerros holandeses. **Anais Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 2014

CARVALHO, C.C.R., BATISTA, M.V.A., SILVA, M.A.R., BALBINO, V.Q., FREITAS, A.C. Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.59, p. 441–447, 2012.

CATROXO, M., MARTINS, A., PETRELLA, S., SOUZA, F., NASRARI, B. Ultrastructural Study of Bovine Papillomavirus During Outbreaks in Brazil. **Int. J. Morphol.**, v. 31, p. 777-784, 2013.

CÉSAR, A.T. Dinamização. **Cultura Homeopática**, v. 5, p. 25-41, 2003.

CLAUS, M. P., VIVIAN, D., LUNARDI, M., ALFIERI, A. F., ALFIERI, A. A. Análise filogenética de papilomavírus bovino associado com lesões cutâneas em rebanhos do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 314–318, 2007.

COELHO, C. **Avaliação de tratamento Homeopático em suínos infectados por *Escherichia coli***. 111f. Tese (Doutorado) - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CORRÊA, W.M. CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2ed., São Paulo: Médica e Científica Ltda, 1992.

COSTA, R.A. **Homeopathies atualizada**. 3ed. Petrópolis: Ed Vozes, 1988.

COSTA, R.A. **Nosódios Vivos**. 1ed. Rio de Janeiro: Farmácia Homeopática Átomo Ltda., 2002.

Dantas, F. **O que é Homeopatia**. 4ed. São Paulo: Brasiliense Primeiros Passos, v.134, 1989.

DEMERS, J. An Introduction to Homeopathy. **North American Veterinary Conference Proceedings** <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2007/SAE/001.asp?LA=1>. (Acesso em: 25 de abril 2015)

DE VILLIERS, E.M., FAUQUET, C., BROKER, T.R., BERNARD, H.U., ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses, **Virology**, v. 324, p. 17–27, 2004.

DONG, J., ZHU, W., GOTO, Y., HAGA, T. Initial detection of a circular genome deletion in a naturally bovine papillomavirus-infected sample. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 75, p. 179–182, 2013.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of clinical virology**, v. 32, p. 7-15, 2005.

DURÃO, J.F.C., FERREIRA, M.L., CABRAL, A., PELETEIRO, M.C., AFONSO, F., CORREIA, J. Aspectos Anatomopatológicos e clínicos da Hematúria Enzoótica dos Bovinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 90, n. 515, p. 132 – 137, jul./set., 1995.

ELZEIN, E.T.E., SUNDBERG, J.P., HOUSAWI, F.M., GAMEEL, A.A., RAMADAN, R.O., HASSANEIN, M.M. Genital bovine papillomavirus infection in Saudi Arabia. **J Vet Diagn Invest.**, v. 3, p. 36-38, 1991. Doi: 10.1177/104063879100300108.

FLORIN, L., SAPP, M., SPODEN, G. A. Host-cell factors involved in papillomavirus entry. *Medical microbiology and immunology*, **Medical microbiology and immunology**, v. 201, n. 4, p. 437-448, 2012.

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U., BALL, L.A. Virus Taxonomy. The Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Family Papillomaviridae. Elsevier; 2005.

FINLAY, M., YUAN, Z.Q., BURDEN, F., TRAWFORD, A., MORGAN, I.M., CAMPO, M.S., NASIR, L. The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. **Virus Res.**, v. 10, p. 04-15, 2009.

FONTES, O.L. **Farmácia Homeopática: Teoria e Prática**. 2ed. São Paulo: Malone, 2001.

FORD, J.N., JENNINGS, P.A., SPRADBROW, P.B., FRANCIS, J. Evidence for papillomaviruses in ocular lesions in cattle. **Res. Vet. Sci.**, v. 32, p. 257–259, 1982.

FREITAS, A.C, SILVA, M.A.R., CARVALHO, C.C.R., BIRGEL, JR.E.H., SANTOS, J.F., BEÇAK, W., STOCCO DOS SANTOS, R.C. Papillomavirus DNA detection in non-epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus, in Mendez-Villas, A. (Eds.), **Communicating Current research and educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, v. 1, p. 697-704, 2007.

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

FREITAS, A.C., SILVA, M.A., JESUS, A.L., MARIZ, F.C., CORDEIRO, M.N., ALBUQUERQUE, B.M., BATISTA, M.V.A. Recent insights into bovine papillomavirus. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 6004–6012, 2011.

FREITAS, A.C., MARIZ, F.C., SILVA, M.A., JESUS A.L. Human papillomavirus vertical transmission: review of current data. **Clin. Infect. Dis.**, v. 56, p. 1451–1456, 2013.

GOTTSCHLING, M., STAMATAKIS, A., NINDL, I., STOCKFLETH, E., ALONSO, Á., BRAVO, I. G. Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 5, p. 1242-1258, 2007.

GOTTSCHLING, M., GÖKER, M., STAMATAKIS, A., OLAF, R.P., BININDA-EMONDS, NINDL, I., BRAVO, I.G. Quantifying the Phylodynamic Forces Driving papillomavirus Evolution. **Mol Biol Evol**, v. 28, n. 7, p. 2101-2113, 2011.

GREGORY, L.F.J, BEÇAK, W., SANTOS, R.C.S. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. **Braz. J. Microbiol.**, v.34, n. 1, p. 76-78, 2003.

HAHNEMANN, S. F. **Organon da arte de curar**. 6ed. São Paulo: Roca, 1979.

HAMA, C., MATSUMOTO, T., FRANCESCHINI, P.H. Papilomatose bovina: avaliação clínica de diferentes produtos utilizados no controle e tratamento. **Ciência Veterinária**, v. 2, n. 2, p. 14, 1988.

HAM, J., DOSTATNI, N., GAUTHIER, J. M., & YANIV, M. The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 16, p. 440-444, 1991.

HARTL, B., HAINISCH, E., SHAFITI-KERAMAT, S., KIRNBAUER, R., CORTEGGIO, A., BORZACCHIELLO, G., TOBER, R., KAINZBAUER, C., PRATSCHER, B., BRANDT, S. Inoculation of young horses with bovine papillomavirus type 1 virions leads to early infection of PBMCs prior to pseudo-sarcoid formation. **J. Gen. Virol.**, v. 92, p. 2437–2445, 2011.

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, n. 1, p. 158-163, 2008.

HATAMA, S., ISHIHARA, R., UEDA, Y., KANNO, T., UCHIDA, I. Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. **Archives of Virology**, v. 156, p. 1281–1285, 2011.

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.

JARRETT, W. F. H., CAMPO, M. S, O'NEIL, B. W., LAIRD, H. M., COGGINS, L.W. A novel bovine papillomavirus (BPV-6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: a member of a proposed new BPV subgroup. **Virology**, v. 136, n. 2, p. 255–264, 1984.

HEDGE, R. S. The papillomavirus E2 proteins – structure, function and biology. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v.31, p.343-360, 2002.

JARRETT, W. F. H., SMITH, K. T., ONEIL, B. W., GAUKROGER, J. M., CHANDRACHUD, L. M., GRINDLAY, G. J., MCGARVIE, G. M., CAMPO, M. S. Studies on vaccination against papillomaviruses – prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. **Virology**, v.184, p.33-42, 1991.

KNOWLES, G., O'NEIL, B. W., CAMPO, M. S. Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas. **J. Virol.**, v. 70, p. 8451–8458, 1996.

KOSSAK-ROMANACH, A. **Homeopatia em 1000 conceitos**. São Paulo: Elcid, 1994.

KUMAR, P., NAGARAJAN, N., SAIKUMAR, G., ARYA, R. S., SOMVANSHI, R. Detection of bovine papilloma viruses in wart-like lesions of upper gastrointestinal tract of cattle and buffaloes. **Transbound. Emerg. Dis.**, 2013. doi: 10.1111/tbed.12127.

LETO, M. D. G. P., JÚNIOR, S., PORRO, A. M., TOMIMORI, J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 2, p. 306-317, 2011.

LINDSEY, C.L., ALMEIDA, M.E., VICARI, C.F., CARVALHO, C., YAGUIU, A., FREITAS, A.C., BEÇAK, W., STOCCO DOS SANTOS, R.C. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. **Genet. Mol. Res.**, v.8, p. 310-318, 2009.

LIU, X. S., ABDUL-JABBAR, I., QI, Y. M., FRAZER, I. H., ZHOU, J. Mucosal immunisation with papillomavirus virus-like particles elicits systemic and mucosal immunity in mice. **Virology**, v. 252, n. 1, p. 39-45, 1998.

LUNARDI, M., ALFIERI, A. A., OTONEL, R. A., DE ALCANTARA, B. K., RODRIGUES, W. B., DE MIRANDA, A. B., ALFIERI, A. F. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus, **Veterinary Microbiology**, v. 162, p. 207-213, 2012.

LUNARDI, M., ALFIERI, A. A., OTONEL, R. A., ALFIERI, A.F. Bovine Papillomaviruses — Taxonomy and Genetic Features. **Current Issues in Molecular Virology - Viral Genetics and Biotechnological Applications INTECH**, <http://dx.doi.org/10.5772/56195>, 2013.

LUZ, K.C.; ZANIN, S.M.W.; DIAS, J.F.G. A utilização de bioterápicos e isoterápicos em Curitiba. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.14, n.1, jan./mar., 2013.

LYRIO, C. **Nosódios Bioterápicos: Repertório**. Rio de Janeiro: C. Lyrio, 2002.

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

MARINHO, Melania. Avaliação experimental de um bioterápico de *Mycoplasma agalactiae* no tratamento de caprinos com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos. 113f. Tese (Doutorado) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008.

MARINS, Raquel. Epidemiologia da papilomatose cutânea bovina e avaliação da eficácia de diferentes tratamentos em micro-regiões do Estado do Rio de Janeiro e Espírito Santo. 127f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2004.

MASUDA, E.K., KOMMERS, G. D., MARTINS, T. B., BARROS, C. S., PIAZER, J. V. Morphological factors as indicators of malignancy of squamous cell carcinomas in cattle

exposed naturally to bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **J. Comp.Pathol.** v.144, p. 48–54, 2011.

MCBRIDE, A. A., SAKAKIBARA, N., STEPP, W. H., JANG, M. K Hitchhiking on host chromatin: how papillomaviruses persist. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1819, p. 820-825, 2002.

MELO, C.B., LEITE, R.C. Papilomatose bovina. **C Vet Tr.**, v.6, n. 1, p.1-12, 2003.

MELO, Tatiana. Avaliação de aberrações cromossômicas em bovinos (*Bos taurus taurus*) infectados pelo papilomavírus bovino. 99f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

MITIDIERO, Ana Maria. **Potencial do uso de Homeopatia, Bioterápicos e Fitoterapia como opção na bovinocultura leiteira: avaliação dos aspectos sanitários e de produção.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

MODIS, Y., TRUS, B.L., HARRISON, S.C. Atomic model of the papillomavirus capsid. **The Embo Journal**, v. 21, p. 4754-4762, 2002.

MONTEIRO, V. L. C., COELHO, M. C. O. C., CARNEIRO, A. S., SILVA, R. F. A. A. Descrição clínica e histopatológica da papilomatose cutânea bovina (BPV). **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.4, p. 1079-1088, 2008.

MOODY, C. A., LAIMINS, L. A. Human Papillomavirus Oncoproteins: Pathways to Transformation. **Nature Reviews Cancer**, v.10, p. 550-560, 2010.

MURO, L. F. F., BOTTURA, C. R. P., PICCININ, A. Papilomatose Bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.10, jan., 2008.

NARECHANIA, A., TERAJ, M., CHEN, Z., DESALLE, R., BURK, R. D. Lack of the Canonical pRBbinding Domain in the E7 ORF of Artiodactyl Papillomaviruses is Associated with the Development of Fibropapillomas. **The Journal of General Virology**, v. 85, p. 1243-1250, 2004.

NASCIMENTO, G. A, SOUZA, E. V. M, CAMPOS-FERREIRA, D. A., ARRUDA, M. S., EKERT, M. H. F., BRUNESKA, D., LIMA-FILHO, J. L. Eletrochemical DNA biosensor for bovine papilomavírus detection using polymeric film on screen-printed electrode. **Biosens Bioelectron**, v. 38, n. 1, p. 61-66, 2012.

NASIR, L., CAMPO, M.S. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids, **Veterinary Dermatology**, v. 19, p. 243-254, 2008.

NASIR, L., GAULT, E., MORGAN, I. M., CHAMBERS, G., ELLSMORE, V., CAMPO, M. S. Identification and functional analysis of sequence variants in the long control region and the E2 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 isolated from equine sarcoids. **Virology**, v. 364, n. 2, p. 355-361, 2007.

NASSIF, M. R. G. **Compendio de Homeopatia.** São Paulo: Robe Editorial, 1997.

NICHOLLS, P. K., STANLEY, M. A. The immunology of animal papillomaviruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, p. 101-127, 2000.

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

OGAWA, T., TOMITA, Y., OKADA, M., SHIRASAWA, H. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7, **J. Gen.Virol.**, v. 88, p. 1934–1938, 2007.

PANGTY, K., SINGH, S., GOSWAMI, R., SAIKUMAR, G., SOMVANSI, R. Detection of BPV-1 and -2 and quantification of BPV-1 by Real-Time PCR in cutaneous warts in cattle and buffaloes. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 185-196, 2010.

PATEL, K. R., SMITH, K. T., CAMPO, M. S. The nucleotide sequence and genome organization of bovine papillomavirus type 4. **J Gen Virol.**, v. 68, p. 2117-2128, 1987. Doi: 10.1099/0022-1317-68-8-2117.

PEREIRA, Ana Isa. **A abordagem homeopática aplicada na prática clínica veterinária: um estudo retrospectivo**. 88f., Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2012.

PESSOA, Nara. **Identificação e avaliação da presença de Papilomavírus bovino (BPV) em sangue de bovinos e cultura de linfócitos em uma fazenda leiteira do estado de Pernambuco**. 78f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

PFISTER, H., LINZ, U., GISSMANN, L., HUCHTHAUSEN, B., HOFFMANN, D., ZUR HAUSEN, H. Partial characterization of a new type of bovine papilloma viroses. **Virology**, v.96, p.1-8, 1979.

QUEIROZ, A. O., XAVIER, S. C. C., FARIA, K. G., BERNARDO, R. R., LEITÃO, T. C. A. Avaliação do bioterápico Trypanosoma cruzi 30 DH: Um Estudo In Vivo. **Cultura Homeopática**, v. 17, p. 9-13, 2006.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

RECTOR, A., VAN RANST, M. Animal Papillomaviruses. **Virology**, v. 445, n. 1, p. 213-223, 2013.

RODRIGUÉZ, F. P., SUAREZ, A. M., ESCADON, A. C., OLIVER, E. A., GONZALEZ, M. A. A., GARCIA, C. G. P. S. Thuja (200 ch, 1000ch) en el tratamiento de la papilomatosis bovina. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**®, ISSN 1695-7504, v. 6, n. 6, jun., 2005.

ROPERTO, S., BORZACCHIELLO, G., ESPOSITO, I., RICCARDI, M., URRARO, C., LUCA, R., CORTEGGIO, A., TATE, R., CERMOLA, M., PACIELLO, O., ROPERTO, F.,: Productive infection of bovine papillomavirus type 2 in the placenta of pregnant cows affected with urinary bladder tumors. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, e33569, doi:[10.1371/journal.pone.0033569](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033569), mar., 2012.

SAMPAIO, A., **Homeopatia em Medicina Veterinária**. Curitiba: El Erial, 1995.

SANTIN, Ana Paula. **Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos e caracterização anatomopatológica**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, 2001.

SANTIN, P. A. G., 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.

SANTOS, E. U. D., SILVA, M. A. R., PONTES, N. E., COUTINHO, L. C. A., PAIVA, S. S. L., CASTRO, R. S., FREITAS, A. C. Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of Cattle. **Transboundary and Emerging Diseases**, doi:10.1111/tbed.12237, 2014.

SHAFTI-KERAMAT, S, HANDISURYA, A, KRIEHLUBER, E, MENEGUZZI, G, SLUPETZKY, K, KIRNBAUER, R. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. **J.Virol.**, v.77, p. 13125–13135, 2003.

SCHMITT, M., FIEDLER, V., MULLER, M. Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPV genotyping assay. **J. Virol. Methods**, v. 170, p. 67-72, 2010.

SCHILLER, J. T., VASS, W. C., LOWY, D. R. Identification of a second transforming region in bovine papillomavirus DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 7880-7884, 1984

SHAH, S. D., DOORBAR, J., GOLDSTEIN, R. A. Analysis of host-parasite incongruence in Papillomavirus evolution using importance sampling. **Mol. Biol. Evol.** 27: 1301–1314, 2010.

SELEGHINI, H. A. O que é o medicamento homeopático. Disponível em: <http://www.drseleghinimedicohomeopata.com.br/> , 2007. Acesso em:10 de fevereiro de 2015.

SILVA, A.M.C.P., SCHWARTZ, F.F., CARDOSO, M.V., CESAR, A.T., SOLLERO, P.A. Uso de bioterápico de Mycoplasma spp. em rebanho bovino leiteiro. **Cult. Homeopat.**, v.4, n.13, p. 43-47, 2005.

SILVA, C.P.S., CARDOSO, M. V.; CÉSAR, A.T; SOLLERO, P. A. Uso de Bioterápico de Mycoplasma Spp. em rebanho Bovino Leiteiro. **Cultura Homeopática**, v.13, p. 43-48, 2005.

SILVA, L.A.F., JAYME, V.S., OLIVEIRA, N.A.B., EURIDES, D., FIORAVANTI, M.C.S., DIAS FILHO, F.C.D. Implante pediculado de papilomas cutâneos e autohemoterapia no tratamento da papilomatose bovina. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.4, n.1, p.83-88, 1998.

SILVA, L.A.F., SANTIN, A.P.I., FIORAVANTI, M.C.S., JAIME, V.S., EURIDES, D., DIAS FILHO, F.C. Avaliação da eficiência de diferentes tratamentos da papilomatose cutânea bovina. **Vet Not.**, v.10, n. 2, p. 35-41, 2004.

SILVA, L.A.F., VERÍSSIMO, A.C.C., VIANA FILHO, P.R.L., FIORAVANTI, M.C.S., EURIDES, D., LINHARES, G..FC. Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamento para a papilomatose bovina. **Rev. Fac. Z. Vet. Agr. Ar.**, v.11, n.1, p.61-76, 2004b.

SILVA, M. A. R., CARVALHO, C. C. R., COUTINHO, L. C. A., REIS, M. C., DE ARAGÃO BATISTA, M. V., DE CASTRO, R. S., DOS ANJOS, F. B. R., DE FREITAS, A. C. Co-infection of bovine papillomavirus and feline-associated papillomavirus in bovine cutaneous warts. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 396, p. 539–547, 2012.

SILVA, M. A. R., PONTES, N. E., DA SILVA, K. M. G., GUERRA, M. M. P., FREITAS, A. C. Detection of bovine papillomavirus type 2 DNA in commercial frozen semen of bulls (*Bos taurus*). *Animal reproduction science*, v. 129, n. 3, p. 146-151, 2011.

SILVA, M.A.R., SILVA, K.M.G., JESUS, A.L.S., BARROS, L.O., CORTEGGIO, A., ALTAMURA, G., BORZACCHIELLO, G., FREITAS, A.C. The presence and gene expression of bovine papillomavirus in the peripheral blood and semen of healthy horses. **Transboundary Emerging Diseases**, <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12036> , 2013.

SILVA, M.S.E., WEISS, M., BRUM, M.C.S., DOS ANJOS, B.L., TORRES, F.D., WEIBLEN, R., FLORES, E.F. Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 603–606, 2010.

SILVESTRE, O., BORZACCHIELLO, G., NAVA, D., IOVANE, G., RUSSO, V., VECCHIO, D., D'AUSILIO, F., GAULT, E. A., CAMPO, M. S., PACIELLO, O. Bovine papillomavirus type 1 DNA and E5 oncoprotein expression in water buffalo fibropapillomas. **Vet. Pathol.** v. 46, p. 636–641, 2009.

SOUZA, Jacqueline. **Clonagem e expressão do gene E6 dp Papilomavirus Bovino tipo 1**. 131f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas/Butantan, Universidade de São Paulo, 2013

STOCCO DOS SANTOS, R. C., LINDSEY, C. J., FERRAZ, O., PINTO, J. R., MIRANDOLA, R. S, BENESI F. J., BIRGEL, E. H., BRAGANÇA, C. A., BEÇAK, W. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. **J. Gen. Virol.**, v. 79, p. 2127-2135, 1998.

STRINGFELLOW, D. A. et al. **Virology**, Michigan: Upjohn, 1988. 139p.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V.: **Plantas tóxicas do Brasil**. Rio de Janeiro: Helianthus, 2000.

TOMITA, Y., LITERAK, I., OGAWA, T., JIN, Z., SHIRASAWA, H., Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. **Virus Genes**, v. 35, p. 243–249, 2007.

VEIGA, V. M. O., BRITO, M. A. V. P., JUNQUEIRA, M. M.; CARVALHO, W. E. G., REIS, E. S. Avaliação de tratamento químico da papilomatose cutânea bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 74-77, 2000.

WADHWA, D. R., PRASAD, B., RAO, V. N., SINGH, M. Efficacy of auto-immunization in bovine cutaneous papillomatosis. **Indian Vet J**, v. 71, p.971-972, 1995.

Who, I. Papillomaviruses. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 64, p. 261- 276, 1995.

WHITE, E. A., HOWLEY, P. M. Proteomic approaches to the study of papillomavirus–host interactions. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 57-69, 2013.

WILLIAM, J.B.; KIRUBAHARAN, J.J.;UTHUMAN, K.M. Survey on incidence and complications of bovine cutaneous papillomatosis. **Indian Veterinary Journal**, Chennai, v. 69, p. 842-844, 1992.

WOSIACKI, Sheila. **Papilomavírus bovino tipo 2 em bexiga de bovinos na hematúria enzoótica: detecção utilizando a reação em cadeia pela polimerase e estudo histopatológico**. 110 f Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, 2002.

WOSIACKI, S. R., BARREIRO, M. A., ALFIERI, A. F., ALFIERI, A. A. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. **J. Virol. Methods.**, v.126, p. 215-219, 2005.

WOSIACKI, S. R., CLAUS, M. C., ALFIERI, A. F., ALFIERI A. A. Bovine papilomavírus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 6, p. 635-638, 2006.

YAGUIU, A., CARVALHO, C., FREITAS, A. C., GÓES, L. G. B., DAGLI, M. L. Z., BIRGEL JR, E. H, BEÇAK, W., STOCCO DOS SANTOS, R. C. Papillomatosis in cattle: in situ detection of bovine papillomavirus DNA sequences in reproductive tissues. **Braz. J. Morphol. Sci.**, v.23, p.525–529, 2006:.

YUAN, Z, GOBEIL, PA, CAMPO, MS, NASIR, L. Equine sarcoid fibroblasts overexpress matrix metalloproteinases and are invasive. **Virology**, v.396, n. 1, p. 143–151, 2010.

YUAN, Z., GAULT, E. A., CAMPO, M. S., NASIR, L. Upregulation of equine matrix metalloproteinase 1 by bovine papillomavirus type 1 is through the transcription factor activator protein-1. **J. Gen. Virol.**, v. 92, p. 2608–2619, 2011.

ZHU, W., DONG, J., SHIMIZU, E., HATAMA, S., KADOTA, K., GOTO, Y., HAGA, T.,: 416 Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing 417 epithelial papilloma. **Archives of Virology**, v. 157, p. 85–91, 2012.

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 ARTIGO 1

Artigo configurado segundo as normas da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira**.

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, CLÍNICO-LABORATORIAL E POSSÍVEL IMPACTO NA REPRODUÇÃO DE BOVINOS LEITEIROS INFECTADOS POR *PAPILLOMAVIRUS BOVINO* (BPV)

ABSTRACT.-

[Epidemiological , clinical laboratory study and possible impact on dairy cattle breeding cattle infected by papillomavirus (BPV)] Estudo epidemiológico, clínico-laboratorial e possível impacto na reprodução de bovinos leiteiros infectados por Papillomavirus Bovino (BPV). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Pesquisa, Instituto Agrônomo de Pernambuco, Estação Experimental de Itambé, Rodovia PE 75 Km 32, Zona Rural, Itambé, PE 55920-000, Brazil. E-mail: patricia.carrazzoni@ipa.br

Studies suggest that the Brazilian cattle herd is highly infected by Bovine Papillomavirus (BPV). The BPVs can cause benign or malignant tumor lesions in the urinary and gastrointestinal tract of cattle, as well as skin lesions, that characterize the clinical syndrome Cutaneous Papillomatosis, leading producers to significant economic losses. Aspects of clinical disease still need to be clarified. Among these , the role of immunity of animals to infection , interference from external factors such as immunosuppressants, the importance of latency sites, the involvement of the reproductive tract and their importance in the spread of the virus , the possible routes of infection , as well as the role of ectoparasites in transmission. Thus, the purpose of the study was to monitor dairy cattle naturally infected with BPV and characterize the clinical, epidemiological and laboratory aspects of the herd. 89 females presenting cutaneous papillomas or not were selected. All animals were infected with BPV demonstrating high rate of infection in the herd. Hematologic evaluations indicated evidence of chronic disease in the herd and were similar between symptomatic and asymptomatic animals. Reproductive commitment was identified in the herd appears to be caused by infection with BPV .

INDEX TERMS: skin lesions, papillomatosis, reproductive tract

RESUMO. - Estudos sugerem que o rebanho bovino brasileiro está altamente infectado pelo Papillomavírus Bovino (BPV). Os BPVs podem causar lesões tumorais benignas ou malignas no trato urinário e trato gastrointestinal de bovinos, além de lesões na pele que caracterizam a síndrome clínica Papilomatose Cutânea, levando os produtores a perdas econômicas significantes. Aspectos da doença clínica precisam ser esclarecidos. Entre estes, o papel da imunidade dos animais frente à infecção, a interferência de fatores externos como imunossupressores, a importância dos sítios de latência, o acometimento do trato reprodutivo e sua importância na disseminação do vírus, as possíveis vias de infecção, assim como o papel dos ectoparasitos na transmissão. Desta forma, o objetivo do estudo foi acompanhar bovinos leiteiros naturalmente infectados por BPV e caracterizar os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais do rebanho. Foram selecionadas 89 fêmeas apresentando ou não papilomas cutâneos. Todos os animais estavam infectados pelo BPV demonstrando alto índice de infecção no rebanho. Avaliações hematológicas indicaram evidência de doença crônica no rebanho e foram semelhantes entre animais sintomáticos e assintomáticos. Foi identificado comprometimento reprodutivo do rebanho que aparenta ser causado pela infecção por BPV.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: lesões cutâneas, papilomatose, trato reprodutivo

INTRODUÇÃO

Estudos sugerem que 60% do rebanho nacional estejam infectados com pelo menos um tipo de Papillomavírus Bovino (BPV) e que, em uma propriedade, cerca de 75% dos animais encontram-se acometidos (Catroxo et al. 2013). A doença está amplamente difundida no rebanho bovino brasileiro e estima-se que o número de casos é expressivamente mais elevado do que o descrito na literatura, embora não haja dados confirmativos (Silva et al. 2004).

Os Papillomavírus Bovinos (BPVs) infectam as células basais do epitélio ou os fibroblastos, são responsáveis por causar lesões tumorais benignas ou malignas no trato urinário e trato gastrointestinal de bovinos, além de lesões na pele que caracterizam a Papilomatose Cutânea, levando os produtores a perdas econômicas significantes (Silva et al. 2004, Monteiro et al. 2008).

Os animais se infectam diretamente por inoculação cutânea, através de soluções de continuidade da pele, por contato direto ou indireto (Stringfellow et al. 1988, Wosiacki, et al. 2005). Entretanto, existem relatos da identificação de vírus em fluidos e tecidos não epiteliais como leite, urina, líquido seminal, sangue, útero, ovário, espermatozoides entre outros tecidos reprodutivos e germinativos, assim como a transmissão do BPV por diferentes espécies de moscas, sugerindo outros reservatórios do vírus assim como a

possibilidade da transmissão vertical, o que demonstra que as vias de transmissão dos BPVs e seus reservatórios não estão totalmente elucidadas e demandam novos estudos. (Stocco dos Santos et al. 1998, Roperto et al. 2008, Diniz et al. 2009, Lindsey et al. 2009, Finlay et al. 2009, Silva et al. 20013, Bocaneti et al. 2014).

Os vírus pertencem à família *Papillomaviridae*, estão classificados em treze genótipos e três gêneros. O gênero *Deltapapillomavirus*, ao qual pertencem os tipos virais BPV-1, -2 e -13, o gênero *Xipapillomavirus*, ao qual pertencem os tipos virais BPV-3, -4, -6, -9, -10, -11 e -12, e o gênero *Epsilonpapillomavirus*, ao qual pertencem os tipos virais BPV-5 e -8. O tipo viral BPV 7 embora identificado, ainda não está classificado em nenhum gênero (Tomita et al. 2007, Hattama et al. 2008, 2011, Freitas et al. 2013, Bocaneti et al. 2014).

Geralmente os papilomas aparecem na superfície do corpo dos animais em média aos 2 anos de idade e os sinais clínicos são observados dentro de 1 a 6 meses após a inoculação do vírus (Campo 2002). O período de incubação é bastante variável e as lesões tendem a regressão, o que está intimamente relacionado com a competência imunológica individual (Silva et al. 2004).

O animal acometido pela papilomatose cutânea pode apresentar complicações como hemorragias, infecções secundárias e feridas mecânicas que ocorrem devido ao atrito dos papilomas grandes ou aglomerados, e podem levar a transtornos gerais tóxicos e a septicemia (Wadhwa et al. 1995, Melo e Leite 2003, Silva 2004b).

A relevância da papilomatose cutânea encontra-se menos na letalidade e mais na sintomatologia secundária causada pela doença como perda de peso, desenvolvimento retardado, infecções secundárias, miíases, problemas reprodutivos, mastite, entre outras alterações clínicas. Estas alterações levam a perdas econômicas devido ao baixo ganho de peso dos animais, perda da eficiência reprodutiva, redução da produção leiteira, manejo da ordenha comprometido, custo com medicamentos, depreciação do couro, e perda de valor zootécnico dos animais acometidos (Muro et al. 2008).

Pesquisas diagnósticas com a identificação do vírus são necessárias para maior compreensão da doença. Embora ao longo dos anos muito conhecimento tenha sido produzido referente aos BPVs e à papilomatose cutânea, vários aspectos precisam ser esclarecidos quanto à biologia do vírus, como a multiplicidade de BPVs nas lesões, os sítios de latência, o papel da imunidade dos animais frente à infecção, a interferência de fatores externos como imunossupressores, o acometimento do trato reprodutivo e sua importância na disseminação do vírus, as possíveis vias de infecção, assim como o papel dos ectoparasitos na transmissão (Nicholls e Stanley 2000, Yagui et al. 2008, Borzacchiolo e Roperto 2008, Roperto et al. 2012, Freitas et al. 2013, Carvalho et al. 2012, Bocanetti et al. 2014, Araldi et al. 2014).

Estudos clínicos por meio de análises da atividade do vírus na natureza são fundamentais para o esclarecimento destes aspectos, podendo contribuir com o controle, tratamento e prevenção da doença. Desta forma, o objetivo do trabalho foi acompanhar bovinos leiteiros naturalmente infectados por BPV e caracterizar os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais do rebanho.

MATERIAL E MÉTODOS

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

O experimento foi realizado no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) - Estação Experimental de Itambé – EEI e no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco.

Para estudo epidemiológico da ocorrência e transmissão do BPV, o rebanho da propriedade, composto por 138 animais, foi avaliado quanto ao manejo nutricional, reprodutivo e sanitário e a propriedade foi avaliada quanto à localização, estrutura física e instalações.

Para o estudo clínico, laboratorial, quanto à condição de infecção e identificação do BPV foram selecionadas no rebanho 89 fêmeas bovinas a partir de 12 meses de idade, identificadas através de brincos numerados, sintomáticas e assintomáticas, das quais foram coletadas amostras sanguíneas.

Amostras de sangue foram colhidas através de venopunção da jugular em tubos tipo “vacutainer” contendo anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético) para hemograma, dosagem da proteína plasmática total (PPT), fibrinogênio (FIB) e extração de DNA para posterior genotipagem do vírus.

Para o hemograma, a contagem do número total de hemácias e leucócitos foi realizada pelo método manual com a utilização de hemocítômetro de Neubauer. A determinação da hemoglobina foi feita pelo método da cianometahemoglobina e o volume globular pelo método do microhematócrito, aplicando-se a técnica descrita por Coles (1984) para o processamento.

O Fibrinogênio (FIB) e as Proteínas Plasmáticas Totais (PPT) das amostras foram determinados empregando-se o refratômetro manual, segundo a técnica descrita por Jain (1993) e Coles (1984), respectivamente.

Para análise dos valores obtidos no hemograma, fibrinogênio e proteínas plasmáticas totais, foram obtidos de cada um dos parâmetros o valor médio, desvio padrão para comparação entre as médias dos animais apresentando lesões cutâneas e os que se mostraram assintomáticos, nas diferentes idades.

Para diagnóstico da infecção por BPV, o DNA genômico foi extraído de uma alíquota de 200µL da amostra sanguínea contendo anticoagulante, através do kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções preconizadas pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado utilizando-se Nanovue (GE, Fairfield, CT, USA), e a qualidade aferida através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) do gene da β-globina como descrito por Freitas et al. (2003). Para genotipagem do vírus, o DNA viral foi amplificado através de PCR utilizando Master Mix Promega Kit (Promega, Fitchburg, WI, USA), primers BPV tipo-específico. Todos os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de Agarose 2% TAE corados com Brometo de Etídio e fotografados.

Para catalogação dos dados, os animais foram divididos em grupos de acordo com a idade e quanto ao desenvolvimento ou não de lesões cutâneas.

RESULTADOS

A Estação Experimental de Itambé está localizada na microrregião Mata Setentrional Pernambucana a uma latitude 07°24'37'' sul e longitude 35°06'46'' oeste, 179 metros acima do nível do mar, área de clima tropical chuvoso com índice pluviométrico médio de 1190 mm³ anuais.

Todos os dados zootécnicos do rebanho eram catalogados, os animais permaneciam isolados na propriedade, não havia saída nem entrada e nenhum contato com rebanho externo.

Eram criados na EEI bovinos da raça 5/8 Girolando, destinados à produção leiteira, separados por faixa etária e o grupo que apresentava lesões cutâneas permanecia em piquete isolado. A propriedade não realizava compra externa de animais e não participava de eventos agropecuários. Transferência eventual de animais entre Estações Experimentais do IPA podia ocorrer, no entanto, os animais vinham de sistema de criação semelhante, eram da mesma raça e permaneciam em experimentos, separados do rebanho da propriedade estudada.

O manejo nutricional, semi-intensivo, utilizava pastagens de Braquiárias, complemento no cocho de volumoso à base de capim elefante (*Penisetum purpureum*) em períodos de estiagem. A água e sal mineral comercial específico para bovinos *ad libitum* eram ofertados em cochos coletivos durante todo o ano. O curral de manejo e os piquetes eram cercados com arame farpado e plantas como a samambaia (*Pteridium aquilinum*) não ocorria na propriedade.

Os animais eram vacinados anualmente contra raiva, semestralmente contra febre aftosa e fêmeas entre três e oito meses de idade, contra brucelose. O rebanho era tratado para parasitos gastrointestinais duas vezes ao ano utilizando-se medicamento alopático injetável. O manejo utilizado para vacinação e controle de parasitos separava os animais por faixa etária e grupo com lesões. Em um mesmo grupo, as agulhas eram compartilhadas. Animais doentes, eram tratados individualmente e utilizava-se agulhas descartáveis.

Carrapatos *Rhipicephalus Boophilus microplus* foram os principais ectoparasitos presentes no rebanho. Representavam problema crônico na, com altos níveis de infestação. Dentre as espécies de moscas que ocorriam na propriedade, a *Haematobia irritans irritans*, mosca-do-chifre, era pouco significativa, *Tabanus modestus*, mutuca, era observada em pequena quantidade e a *Musca domestica* era frequente no curral da ordenha. *Cochliomya hominivorax* foi a mais relevante no rebanho, sendo comumente observadas miíases em lesões causadas pelos carrapatos e em papilomas traumatizados.

O manejo reprodutivo utilizava inseminação artificial exclusiva, com sêmen produzido em centrais nacionais, sem presença de touros no rebanho. A ordenha da propriedade era diária, manual, no período da manhã e da tarde.

O manejo dos bezerros utilizava a permanência com a mãe nas primeiras 48 horas. Após este período, mamada de colostro/leite de um teto duas vezes ao dia durante dois meses, seguido de redução gradativa até os sete meses de idade quando era realizado o desmame. A partir da segunda semana de vida era ofertado concentrado para bezerros lactentes duas vezes ao dia e volumoso em piquetes de braquiária.

O rebanho era composto por 138 bovinos, dos quais, 107 fêmeas jovens e adultas, 12 bezerros com idade inferior a um ano e 19 machos jovens isolados, participando de outros experimentos. A partir dos critérios determinados, foram selecionadas 89 fêmeas apresentando ou não papilomas cutâneos. A representação esquemática do rebanho da propriedade, animais avaliados e frequência da infecção pelo BPV estão demonstrados na Fig.1.

Os animais foram divididos em três grupos de acordo com a faixa etária. **Grupo 1** animais de 1 a 4 anos, **Grupo 2** animais de 5 a 9 anos e **Grupo 3** animais de 10 a 16 anos. Todos estavam infectados pelo BPV (89/89, 100%). No Grupo 1, 78,9% dos animais apresentaram lesões cutâneas, no Grupo 2, 21,2% e no Grupo 3, 11,1%. A idade dos animais em relação à presença de lesões cutâneas e infecção pelo BPV estão demonstradas na Fig. 2.

Os animais sem lesões cutâneas (50/89) não apresentaram sinais e sintomas clínicos. Não houve apatia, hiporexia e perda de peso, demonstrando condição clínica compatível com animais saudáveis. Os animais com papilomas cutâneos apresentaram quadro clínico diferenciado de acordo com o grau de intensidade das lesões. Animais com poucas lesões (26/39) não demonstraram quadro clínico evidente de doença sistêmica, semelhante ao estado clínico dos animais assintomáticos. Treze animais (13/39) apresentaram muitas lesões, miíases frequentes, sangramento de lesões após traumatismos, alguns com apatia, hiporexia, perda de peso e três animais vieram a óbito.

Os parâmetros hematológicos dos animais com e sem papilomas cutâneos, em diferentes faixas etárias, estão demonstrados nas Fig. 3 e 4. Os valores médios para os elementos que constituem o Eritrograma, para os animais dos Grupos 1, 2 e 3, com lesão e sem lesão, se encontravam dentro dos limites fisiológicos para a espécie bovina. Não foram observadas diferenças entre as médias quando comparados animais com e sem lesão, mesmo em diferentes idades.

Entre os animais com lesões, a hematimetria, a concentração de hemoglobina e o hematócrito dos animais dos Grupos 1 e 2 mostrou-se inferior quando comparado à média dos animais nestas idades sem lesões. Os animais do Grupo 3 apresentaram médias superiores para estes parâmetros hematológicos quando comparados aos animais da mesma faixa etária sem lesões (Fig. 3).

Na dosagem de Proteínas Plasmáticas Totais, todos os animais apresentaram hiperproteinemia. Os animais do Grupo 1 com lesões cutâneas demonstraram valores médios de 9,4g/dL, o Grupo 2 de 9,7g/dL e o Grupo 3 de 10g/dL. Os animais sem lesões cutâneas demonstram valores médios de 9,93g/dL para o Grupo 1, 9,9g/dL Grupo 2 e de 9,8g/dL para o Grupo 3 (Fig. 3).

A concentração média de fibrinogênio foi inferior a 300mg/dL para todos os animais, valor limítrofe de referência para bovinos. Os animais do Grupo 1, com lesões, apresentaram a maior média de fibrinogênio (280mg/dL) e os animais do Grupo 3, também com lesões, apresentaram a menor média de fibrinogênio (100mg/dL) (Fig. 3.).

Os parâmetros leucocitários dos bovinos avaliados estão demonstrados na Fig. 4. Entre os animais com lesões cutâneas, o Grupo 1 apresentou leucocitose, que ocorreu por neutrofilia e linfocitose. Os animais sem lesões cutâneas do Grupo 1 e 2 apresentaram leucocitose por monocitose.

Os índices reprodutivos das fêmeas avaliadas estão demonstrados na Fig. 5. No Grupo 1, com lesões cutâneas, 27/30 fêmeas não apresentaram estro, destas 11 tinham um ano de idade e 16 tinham entre dois e quatro anos. Nas fêmeas sem lesões cutâneas do Grupo 1, três animais (3/8) não apresentaram estro, três animais (3/8) foram inseminados e um retornou ao estro com repetição da inseminação artificial.

No Grupo 2 com lesões, seis animais (6/7) não apresentaram estro, e entre os animais sem lesões, 12 (12/26) não apresentaram estro, oito (8/26) foram inseminadas, das quais seis repetiram estro e foram novamente inseminadas.

No Grupo 3 com lesões, dois animais (2/2) não apresentaram estro. Entre os animais sem lesões, 9 (9/16) não apresentaram estro e seis (6/16) foram inseminadas, uma retornou ao cio e foi repetida a inseminação.

DISCUSSÃO

Os animais avaliados representaram 64,5% do rebanho e 100% estavam infectados pelo BPV, superando a estimativa feita por Catroxo et al. (2013). Dentre os animais infectados, a maior parte (56,2%) não apresentava lesões de pele características da doença, embora tenham sido diagnosticadas alterações hematológicas e reprodutivas sugestivas de doença crônica, que poderiam ser causadas pelo BPV. Animais assintomáticos ou que desenvolvem poucas lesões atuam como reservatório da doença, disseminam o vírus, são livremente comercializados e introduzidos em outros rebanhos, o que ressalta a importância da divulgação e esclarecimento de produtores e veterinários acerca do vírus.

Dados clínicos e epidemiológicos sobre o BPV e a papilomatose cutânea bovina são importantes para o controle e prevenção. O estudo foi realizado em uma fazenda experimental pela primeira vez em Pernambuco e no Nordeste, tornando possível acompanhar vários aspectos da doença, conhecer a realidade local e as diferenças entre relatos anteriores na região, no Brasil e no mundo.

A propriedade estudada, como selecionadora da raça Girolando e estação de pesquisa, detinha todo o controle sobre os dados zootécnicos, histórico de desenvolvimento e produção dos animais tornando possível algumas suposições quanto à fonte de infecção, a forma como os animais se infectam e quando esta infecção ocorre.

O Girolando, em seus diferentes graus sanguíneos, é a raça de maior expansão e crescimento no mercado nacional, responsável por 80% do leite produzido no Brasil (Silva et al. 2010). São animais mais rústicos por possuírem sangue indiano, no entanto, a raça é tão susceptível ao BPV quanto os taurinos puros como a raça Holandesa. Acredita-se, entretanto, que o tipo de manejo empregado esteja mais relacionado à infecção e desenvolvimento de lesões do que a raça dos animais, o que está de acordo com Santin (2001) e Araldi (2014) ao afirmarem que o rebanho leiteiro é mais afetado. O momento da ordenha é um período de maior aglomeração e contato entre fêmeas leiteiras e entre os animais e as instalações. A frequência dessa aglomeração expõe os animais, aumentando a chance de infecção. Quanto maior a proximidade e o contato entre os animais e o stress a que são submetidos no manejo, maior a chance de se infectarem e desenvolverem lesões (Santo e Marins 2004).

O manejo semi-intensivo, utilizado na propriedade, permite um contato maior entre os animais. Os que desenvolveram lesões permaneceram separados do rebanho, mas utilizavam áreas comuns como o brete e curral de manejo. Para maioria das propriedades é inviável a permanência de um piquete exclusivo para animais acometidos pela papilomatose por comprometer para o manejo, elevar custos e pela deficiência de pasto. Com frequência, os animais são vendidos ou permanecem junto com o restante do rebanho.

Os cochos de água e sal podem ser uma importante fonte de infecção (Santo e Marins 2004). Na propriedade estudada e naquelas que empregam o manejo semi-intensivo, são os únicos utilizados durante todo o ano. A presença de BPV em bexigas de animais infectados sugere que a urina pode ser uma fonte de infecção, havendo a possibilidade de contaminação da água, dos pastos, cochos e bebedouros (Lindsey et al. 2009).

Em propriedades de Pernambuco o *Pteridium aquilinum* não é frequente (Carrazzoni, 2015). Na Zona da Mata, mais úmida e na região da bacia leiteira, agreste do Estado, não são observados nos pastos, justificando a baixa frequência de lesões tumorais no trato gastrointestinal, urinário e ausência de hematuria enzoótica, responsáveis por maiores danos causados pelo BPV. Este fato, associado à frequência de papilomatose cutânea de intensidade leve comumente observada entre os animais, provavelmente contribui para que a presença do vírus seja subestimada nas propriedades.

O arame farpado, utilizado em cercas e currais, é uma constante causadora de lesões da pele e favorece a disseminação da doença, principalmente em currais de manejo onde os animais se aglomeram e se encostam, na tentativa de se esquivar e refugiar.

O uso de agulhas contaminadas, seja para tratamento ou vacinação do rebanho, é uma importante fonte de infecção do BPV (Santos et al. 2002, Santo e Marins 2004). Na propriedade estudada o risco foi minimizado ao utilizar agulhas estéreis individuais descartáveis, esterilizadas, e separação dos animais em grupos por idade e aqueles com lesões. Na rotina atual do campo, no entanto, dificilmente será utilizada agulha individual ou descartável por animal, mas sugere a necessidade da indústria especializada criar alternativa, que os veterinários de campo atentem para o problema e organizem o manejo reduzindo a possibilidade de disseminação do vírus e principalmente, ressalta a importância de levantamento epidemiológico do vírus nos rebanhos.

Os carrapatos dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, são ectoparasitos de hospedeiro único. As larvas sobem nos animais, se fixam, se desenvolvem até o estágio de fêmea ingurgitada e se desprendem dos hospedeiros caindo ao chão para realizarem a ovoposição e em seguida morrem (Morando e Gelinsky 2010). Esta característica do ciclo biológico dos *R. Boophilus microplus*, dificulta a transmissão direta do BPV de um hospedeiro a outro no momento do repasto sanguíneo, como pode ocorrer com as moscas picadoras-sugadoras, e indica que a atuação destes artrópodes na epidemiologia da doença esteja mais relacionada às micro e macro lesões que causam na pele dos animais, ao comprometimento da imunidade causado pela depleção sanguínea e o stress, favorecendo o desenvolvimento de doenças secundárias, do que à transmissão direta entre animais.

No entanto, assim como ocorre para a Babesiose, em que a *Babesia bigemina* infecta tecidos do carrapato e pode ser transmitida pela via transovariana originando ovos, larvas e ninfas de carrapatos infectados por este parasito (Massard e Fonseca 2004), o *R. Boophilus microplus* poderia atuar disseminando BPV. Em análise comparativa, embora tratando-se de um vírus, questiona-se a possibilidade do BPV ingerido durante o repasto sanguíneo da teleógina em animal infectado, permanecer viável no organismo do carrapato, no trato reprodutivo e ser transmitido aos ovos pela via transovariana. São suposições que precisam ser investigadas e poderão contribuir com o estudo epidemiológico do vírus.

As moscas picadoras-sugadoras parecem ter pouca importância na epidemiologia da papilomatose cutânea na propriedade estudada devido a baixa frequência. As miíases causadas pela *Cochliomya* são as doenças clínicas mais frequentes do rebanho estudado, responsáveis por feridas que sangram contaminando cercas, mourões onde os animais se coçam, cochos, e bretes, favorecendo a disseminação do vírus no rebanho e atraindo outras moscas, inclusive a doméstica, que segundo Finlay et al. (2009), também foi identificada carregando BPV e pode, ao pousar em feridas ou sangue contaminado, levar o vírus a outros animais. A *Musca domestica* é muito frequente em propriedades leiteiras, atraídas por restos de leite e embora controladas por higiene das instalações, não são identificadas pelos produtores como vetores de doenças, nem do BPV.

A ocorrência de morcegos hematófagos na propriedade chama atenção e sugere outra via possível de transmissão do BPV entre os animais estudados e entre propriedades. A área de alcance e sobrevivência dos morcegos é maior que a dos insetos, causam feridas que sangram devido a atuação de fatores anti-coagulantes da saliva, o que favorece a contaminação dos animais por contato com sangue infectado, e sugere-se que podem causar transmissão direta ao inocular o vírus através do aparelho bucal contaminado.

Todas as bezerras de 1 ano de idade apresentavam lesões cutâneas. Nos animais mais velhos a frequência dos que desenvolveram lesões e quadro clínico acentuado foi regredindo, demonstrando que se tornaram mais resistentes ou imunologicamente aptos a impedir o desenvolvimento de lesões, porém permaneceram infectados. Os animais jovens entre 1 e 2 anos são mais afetados clinicamente como descrito por Monteiro (2008) em estudo desenvolvido na mesma região. A elevada susceptibilidade de jovens a infecções é uma evidência de que animais mais velhos adquiriram imunidade em episódios anteriores (Nichols e Stanley, 2000).

O perfil do eritrograma dos animais mostra que o rebanho estava bem alimentado, com ausência de doenças debilitantes como babesiose e anaplasiose e que estes parâmetros não foram determinantes para o desenvolvimento de papilomas, já que se apresentaram semelhantes entre animais com e sem lesões cutâneas.

O quadro de hiperproteinemia leve (Kaneko et al. 1997) encontrada em todos os bovinos avaliados, e pouco superior nos animais mais velhos, pode ser considerada fisiológica devido a ausência de anemia e desidratação sugerindo como causas prováveis a dieta rica em proteínas (Monteiro, 2008) ou particularidade da raça (Souza 1997, Fagliari et al. 1998). Outra justificativa poderia ser uma elevação de gamaglobulinas como consequência de infecção crônica, neste caso, secundária à infecção pelo BPV.

O fibrinogênio plasmático é uma proteína sinalizadora de fase aguda nos bovinos (Fagliari et al. 1998). A concentração de fibrinogênio se eleva na presença de inflamação e reparos teciduais e precede o aumento de gamaglobulinas. Em doenças crônicas, no entanto, o fibrinogênio volta ao limite normal dias após o encerramento da destruição tecidual com elevação da gamaglobulina (Phillips et al. 1984, Jain et al. 1993, Murata et al. 2004, Silva et al. 2006). A baixa concentração de fibrinogênio nos animais avaliados com elevada PPT estão de acordo com os achados dos autores citados, demonstrando o caráter crônico da infecção por BPV no rebanho e ausência de outras doenças clínicas de caráter agudo como Babesiose e Anaplasiose.

Os animais sem lesões demonstraram leucograma compatível com doença crônica e na presença de stress. A resposta imunológica mediada por células é mais importante para regressão de lesões causadas pelo BPV do que a resposta humoral (Nicholls e Stanley 2000). Os animais jovens mais afetados por lesões demonstraram quadro clínico mais grave. Este achado provavelmente se refletiu no leucograma, que demonstrou a tentativa do organismo em regredir as lesões. Segundo Coles et al. (1984), leucometria global alta por neutrofilia indica condição severa. Por outro lado a linfocitose ocorre em infecções crônicas devido ao estímulo antigênico constante.

Os bovinos respondem menos em termos de leucometria global que outros animais domésticos, sendo observada a contagem de leucócitos totais dentro da faixa de normalidade na presença de evidências de infecção ou stress (Coles et al. 1984). Sob este aspecto observa-se que os animais sem lesões apresentaram contagem elevada de leucócitos, demonstrando que embora aparentemente saudáveis estes animais estavam acometidos e sua condição embora subclínica pode refletir negativamente nos resultados produtivos e reprodutivo do rebanho, sem a percepção do produtor e mesmo do veterinário responsável.

Freitas et al. (2003, 2007), relatam a presença de BPV1 na placenta e líquido amniótico de fêmea bovina e de seu recém nascido mostrando a evidência da transmissão vertical do BPV (Yagui et al. 2006, 2008). A elevada taxa de infecção encontrada nas fêmeas e nos bezerros acompanhados sugere que estes possam estar se infectando já na vida intrauterina. Esta afirmação é corroborada por achados de Carrazzoni (2015) ao identificar BPV em sangue retirado da jugular de fetos entre 4 e 5 meses, filhos de vacas também infectadas pelo vírus.

Lindsey et al. (2009) identificaram BPV no leite, evidenciando a possibilidade de transmissão através da mamada. Tendo em vista que o manejo da propriedade estudada adota a mamada do colostro e do leite até os seis meses de idade, inseminação exclusiva e não há entrada de animais externos, esta seria mais uma possível forma de infecção dos animais.

As fêmeas jovens de 1 ano podem, quando precoces e bem alimentadas, apresentar estro nesta idade, porém não é comum na raça 5/8 Girolando (Oliveira e Nogueira 2006), desta forma a ausência de estro entre os animais de 1 ano era um resultado esperado. A partir dos 18 meses, no entanto, as fêmeas por estarem em condições corporais adequadas deveriam iniciar as atividades reprodutivas com apresentação de estro, o que ocorreu abaixo do esperado (Santos et al. 2002).

A ausência de ciclo estral nas fêmeas com lesões cutâneas sugere que a doença clínica causada pelo BPV afeta o animal de forma sistêmica suprimindo a atividade reprodutiva. Em condições adversas o sistema reprodutivo dos animais pode entrar em anestro como consequência da apatia, subnutrição, perda de peso, stress e doença clínica (Mello 2015).

As causas primárias de problemas reprodutivos podem ocorrer de forma epidêmica ou endêmica. A introdução de um agente infeccioso determina que os problemas reprodutivos ocorram de forma epidêmica, com vários animais apresentando sintomatologia reprodutiva simultaneamente. Em rebanhos cronicamente infectados, as causas primárias manifestam-se de forma endêmica, onde os animais, ou apenas algumas categorias, manifestam sinais clínicos reprodutivos (Junqueira e Alfieri 2006). Como o rebanho estava com bom escore corporal, não apresentava outras doenças clínicas, não havia abortos, trânsito de animais e animais errantes, eram vacinados para brucelose, havia controle de roedores e na presença de frequência elevada de animais infectados por BPV, pode-se suspeitar da infecção crônica pelo vírus como responsável pelos baixos índices reprodutivos no rebanho.

A baixa frequência de estro e elevada repetição de inseminações artificiais indicaram problemas reprodutivos no rebanho, que ocorriam em animais apresentando ou não lesões cutâneas. Como a propriedade utiliza inseminação artificial exclusiva, com sêmen adquirido em centrais de sêmen, o retorno ao estro e repetições de inseminações artificiais podem ter ocorrido como consequência de sêmen contaminado por BPV, induzindo reabsorção embrionária. Silva et al. (2011) detectaram BPV nos espermatozoides e fluido seminal de quatro centrais de sêmen e Henneberg et al. (2006) demonstraram que o desenvolvimento de embriões de duas células é inibido depois da exposição ao HPV. Há, portanto, uma indicação de que a presença do vírus no sistema reprodutivo de touros é possível e frequente, e demanda mais estudos a fim de se avaliar a interferência nas taxas de prenhez do rebanho e a via de transmissão vertical do vírus.

O BPV e as doenças clínicas causadas pelo vírus ainda não são consideradas doenças de impacto reprodutivo, embora a literatura relate o diagnóstico do vírus em tecidos, células e fluidos do sistema reprodutor como útero, ovários, oócitos, células do cumulus, líquido amniótico, fluido uterino, placenta, sêmen e espermatozoides (Carvalho et al. 2003, Yagui et al. 2006, 2008, Silva et al. 2011).

A infecção do trato reprodutivo pelo vírus pode ter severas consequências como disseminação do agente infeccioso, baixa fertilidade, esterilidade, abortos e transmissão vertical (Silva et al. 2011). Neste estudo muitos dados sugerem a atuação do vírus no sistema reprodutor das fêmeas e no sêmen. Muitos aspectos precisam ser investigados e comprovados para que o BPV seja considerado responsável por doença de impacto reprodutivo.

CONCLUSÃO

A frequência de infecção por BPV em animais apresentando ou não lesões cutâneas é elevada no rebanho.

Animais assintomáticos são os mais frequentes dentre os infectados por BPV na propriedade estudada.

Avaliações hematológicas demonstraram evidência de doença crônica no rebanho e foram semelhantes entre animais sintomáticos e assintomáticos.

A alta infestação de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é importante na epidemiologia da papilomatose cutânea do rebanho por causar lesões cutâneas que favorecem a disseminação do vírus.

Existe na propriedade um comprometimento reprodutivo do rebanho que aparenta ser causado pela infecção por BPV.

REFERÊNCIAS

Araldi R. P., Carvalho, R. F., Melo, T. C., Diniz, N. S. P., Sant'Ana, T. A., Mazzuchelli-de-Souza, J., Spadacci-Morena, D. D., Beçak, W., Stocco, R. C., 2014. Bovine Papillomavirus in the beef cattle: first

- description of BPV-12 and putative type BAPV8 in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 13 (3), 5644-5653.
- Bocaneti, F., Altamura, G., Corteggio, A., Velescu, E., Roperto, F., Borzacchiello, G. 2014. Bovine Papillomavirus: New Insights into an Old Disease. *Transboundary Emerging Diseases*, <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12222>.
- Borzacchiello, G., Roperto, F., 2008: Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary Research* 39, 45.
- Campo M.S., 2002: Animal model of papillomavirus pathogenesis, *Virus Res.*, v. 89, p.249–261.
- Carrazzoni, P. G., Departamento de Pesquisa, Instituto Agronômico de Pernambuco, Estação Experimental de Itambé, Rodovia PE 75 Km 32, Zona Rural, Itambé, PE 55920-000, Brazil. E-mail: patricia.carrazzoni@ipa.br.
- Carvalho, C.C.R., Batista, M.V.A., Silva, M.A.R., Balbino, V.Q., Freitas, A.C., 2012. Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. *Transboundary and Emerging Diseases* 59, 441–447.
- Catroxo, M., Martins, A., Petrella, S., Souza, F., Nasrari, B., 2013. Ultrastructural Study of Bovine Papillomavirus During Outbreaks in Brazil. *Int. J. Morphol.* 31, 777-784.
- Coles, E.H. *Patologia Clínica Veterinária*. 3ed. São Paulo, Manole, 1984, 468p.
- Claus, M.P., Vivian, D., Lunardi, M., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2007. Análise filogenética de papilomavírus bovino associado com lesões cutâneas em rebanhos do Estado do Paraná. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 27, 314–318.
- Diniz, S. P.N., STOCCO, R.C. Orientador. Identificação e avaliação da presença de Papilomavírus bovino (BPV) em sangue de bovinos e cultura de linfócitos em uma fazenda leiteira do estado de Pernambuco. 2009.
- Fagliari, J. J., Santana, A. E., Lucas, F. A., Campos, E., e Curi, P. R. 1998: Constituintes sanguíneos de bovinos lactantes, desmamados e adultos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, p. 263-271, 1998.
- Finlay, M., Yuan, Z., Burden, F., Trawford, A., Morgan, I. M., Campo, M. S., & Nasir, L. 2009: The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. *Virus research*, v. 144, n. 1, p. 315-317.
- Freitas, A.C, Silva, M.A.R., Carvalho, C.C.R., Birgel, Jr.E.H., Santos, J.F., Beçak, W., Stocco dos Santos, R.C. (2007). Papillomavirus DNA detection in non-epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus, in Mendez-Villas, A. (Eds.), *Communicating Current research and educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 1: 697-704.
- Freitas, A.C., Carvalho, C., Brunner, O., Birgel, Junior E. H., Dellalibera, A.M.M.P., Benesi, F. J., Gregory, L., Beçak, W., Stocco dos Santos, R.C. 2003: Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Braz. J. Microbiol.* 34, 76–78.
- Freitas, A.C., Mariz, F.C., Silva, M.A., Jesus A.L. 2013: Human papillomavirus vertical transmission: review of current data. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1451–1456.
- Hatama, S., Ishihara, R., Ueda, Y., Kanno, T., Uchida, I., 2011. Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. *Archives of Virology* 156, 1281–1285.
- Hatama, S., Nobumoto, K., Kanno, T., 2008. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *Journal of General Virology* 89, 158–163.
- Jain, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993, 417p.
- Junqueira, J.R.C.; Alfieri, A.A. 2006: Falhas da reprodução na pecuária bovina de corte com ênfase para causas infecciosas. *Semina: Ciências Agrárias*, v.27, n.2, p.289-298.
- Kaneko J.J., Harvey J.W. e Bruss M.L. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6ed. Academic Press, San Diego. 904p.
- Lindsey, C. J., Almeida, M. E., Vicari, C. F., Carvalho, C., Yagui, A., Freitas, A. C., Stocco, R. C. 2009: Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genetics and Molecular Research*, 8(1), 310-318.
- Massard, C. L., & Fonseca, A. H. 2004: Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. *A Hora Veterinária*, v. 135, n. 1, p. 15-23.
- Melo, C.B., Leite, R.C. Papilomatose bovina. *C Vet Tr* 2003;6(1):1-12.
- Mello, R. R. C. 2015: Perdas reprodutivas em fêmeas bovinas. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v. 10, n. 4, p. 07-23.

- Monteiro, V. L. C., Coelho, M. C. O. C., Carneiro, A. S., Silva, R. F. A. A. 2008. Descrição clínica e histopatológica da papilomatose cutânea bovina (BPV). *Ciência Animal Brasileira* v.9, n.4, p. 1079-1088.
- Morando, A., e Gelinski, J. M. L. N. 2010: Estudo preliminar do desenvolvimento embrionário in vitro de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Unoesc & Ciência-ACBS*, v. 1, n. 1, p. 23-28.
- Murata, H.; Shimada, N.; Yoshioka, M. 2004: Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, v.168, p.28-40.
- Muro, L. F. F., Bottura, C. R. P., Piccinin, A. 2008. Papilomatose Bovina. *Revista científica eletrônica de Medicina Veterinária – Ano VI*, n.10 – ISSN: 1679-7353.
- Nicholls, P. K. e Stanley, M. A., 2000. The immunology of animal papillomaviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 73, 101-127.
- Oliveira, D.J.C. e NOGUEIRA, G.P. 2006: Curvas de crescimento de bezerras da raça girolando. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 9, n. 1, p. 3-8.
- Phillips, W.A. 1984: The effects of assembly and transit stressors on plasma fibrinogen concentration of beef calves. *Can J Comp Med*, v.48, p.35-41.
- Roperto, S., Borzacchiello, G., Esposito, I., Riccardi, M., Urraro, C., Lucà, R., Roperto, F. (2012). Productive infection of bovine papillomavirus type 2 in the placenta of pregnant cows affected with urinary bladder tumors., v. 7, n. 3, p. e33569, 2012.
- Roperto, S., Brun, R., Paolini, F., Urraro, C., Russo, V., Borzacchiello, G., ... & Venuti, A. (2008). 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. (2001) Estudo da papilomatose cutânea em bovinos leiteiros: comparação de diferentes tratamentos e caracterização anatomopatológica. (Dissertação) Escola de Veterinária Universidade Federal de Goiás, 147p.
- Santo, E. e Marins, R.S.Q.S. 2004. Epidemiologia da papilomatose cutânea bovina e avaliação da eficácia de diferentes tratamentos em micro-regiões dos estados do rio de janeiro. (Dissertação) Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy de Queiroz, 127p.
- Santos, G. T., Damasceno, J. C., Massuda, E. M., Cavalieri, F. L. B. 2002: Importância do manejo e considerações econômicas na criação de bezerras e novilhas. *Anais do II Sul- Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil*, v.1, p.239-267.
- Santos, N.S.O. 2002: Diagnóstico Laboratorial das Víroses. In: *Introdução a virologia humana*. Santos, N.S.O, Romanos, M.T.V., Wigg, M.D. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p.25-46.
- Silva, E. B. 2006: Avaliação leucocitária, relação albumina/globulina, proteína plasmática e fibrinogênio de bovinos da raça nelore, confinados e terminados a pasto. (Dissertação) Escola de Veterinária Universidade Federal de Goiás, 83p.
- Silva, L.A.F., Santin, A.P.I., Fioravanti, M.C.S., Jaime, V.S., Eurides, D., Dias Filho, F.C. Avaliação da eficiência de diferentes tratamentos da papilomatose cutânea bovina. *Vet Not*. 2004;10(2):35-41.
- Silva, L.A.F., Veríssimo, A.C.C., Viana Filho, P.R.L., Fioravanti, M.C.S., Eurides, D., Linhares, G.F.C. Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamento para a papilomatose bovina. *Rev Fac Z Vet Agr Ar* 2004b;11(1):61-76.
- Silva, M.A.R., Silva, K.M.G., Jesus, A.L.S., Barros, L.O., Corteggio, A., Altamura, G., Borzacchiello, G., Freitas, A.C., 2013. The presence and gene expression of bovine papillomavirus in the peripheral blood and semen of healthy horses. *Transboundary Emerging Diseases*, <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12036>.
- Souza, P. M. 1997: Perfil bioquímico sérico de bovinos das raças gir, holandesa e girolanda, criados no Estado de São Paulo. Influência de fatores de variabilidade etários e sexuais. 1997. 168f. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997 São Paulo–SP.
- Stocco dos Santos et al., 1998, Stocco dos Santos R.C., Lindsley C.J., Ferraz O.P., Pinto J.R., Miranda R.S., Benesi F.J., Birgel E.H., Braganca Pereira C.A., Becak W., Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model, *Journal of General Virology* 79, 1998, 2127 – 2135.
- Stringfellow, D. A. et al. *Virology*. Michigan: Upjohn, 1988. 139p.
- Tomita, Y., Literak, I., Ogawa, T., Jin, Z., Shirasawa, H., 2007. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes* 35, 243–249.
- Wadhwa, D.R., Prasad, B., Rao, V.N., Singh, M. Efficacy of auto-immunization in bovine cutaneous papillomatosis. *Indian Vet J*, v. 71, p.971-972, 1995.

- Wosiacki, S.R., Barreiro, M.A., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A. (2005). Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *J. Virol. Methods* 126: 215-219.
- Yagui, A., C. Carvalho, A. C. Freitas, L. G. B. Go´es, M. L. Z. Dagli, E. H. Birgel Jr, W. Becak, and R. C. Stocco dos Santos, 2006: Papillomatosis in cattle: in situ detection of bovine papillomavirus DNA sequences in reproductive tissues. *Braz. J. Morphol. Sci.* 23, 525–529.
- Yagui, A., Dagli, M. L. Z., Birgel Jr, E. H., Alves Reis, B. C., Ferraz, O. P., Pituco, E. M., Stocco, R. C. 2008: Simultaneous presence of bovine papillomavirus and bovine leukemia virus in different bovine tissues: in situ hybridization and cytogenetic analysis. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, n. 2, p. 487-497, 2008.

Legendas das Figuras

- Fig. 1. Demonstração esquemática do rebanho acompanhado e frequência de BPV nos animais estudados.
- Fig. 2. Idade dos animais, condição de infecção e presença de lesões cutâneas em bovinos naturalmente infectados por BPV - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).
- Fig. 3. Eritrograma, PPT e Fibrinogênio de bovinos infectados por BPV apresentando ou não lesões cutâneas- Itambé, Pernambuco (2015).
- Fig. 4. Parâmetros leucocitários de bovinos infectados por BPV apresentando ou não lesões cutâneas- Itambé, Pernambuco (2015).
- Fig. 5: Índices reprodutivos de fêmeas infectadas por BPV apresentando ou não lesões cutâneas - Itambé, Zona da Mata (2015).

Fig. 1.

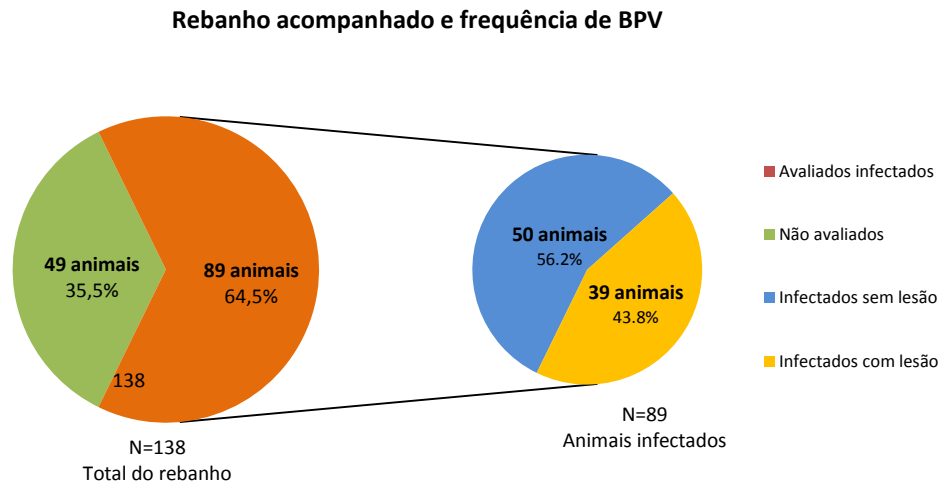


Fig. 2.

Grupos	Número de animais infectados BPV	Com lesões cutâneas	Sem lesões cutâneas
Grupo 1 1 a 4 anos	38	30	8
1 ano	11	11	-
2 anos	13	11	2
3 anos	7	6	1
4 anos	7	2	5
Grupo 2 5 a 9 anos	33	7	26
5 anos	11	2	9
6 anos	6	3	3
7 anos	5	2	3
8 anos	3	-	3
9 anos	8	-	8
Grupo 3 10 a 16 anos	18	2	16
10 anos	3	-	3
11 anos	1	-	1
12 anos	6	-	6
13 anos	2	1	1
15 anos	2	-	2
16 anos	4	1	3
Total	89	39	50

Fig. 3.

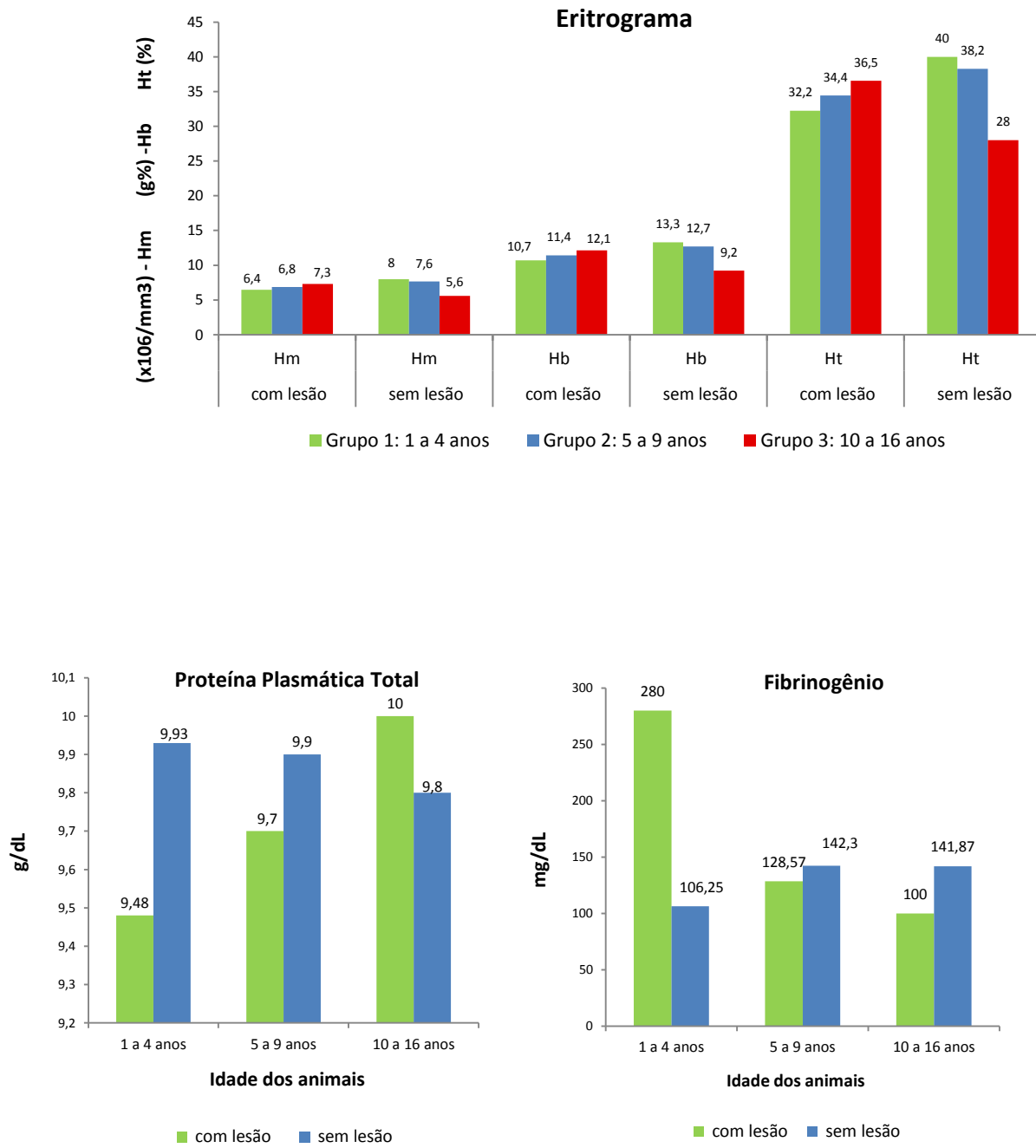


Fig. 4.

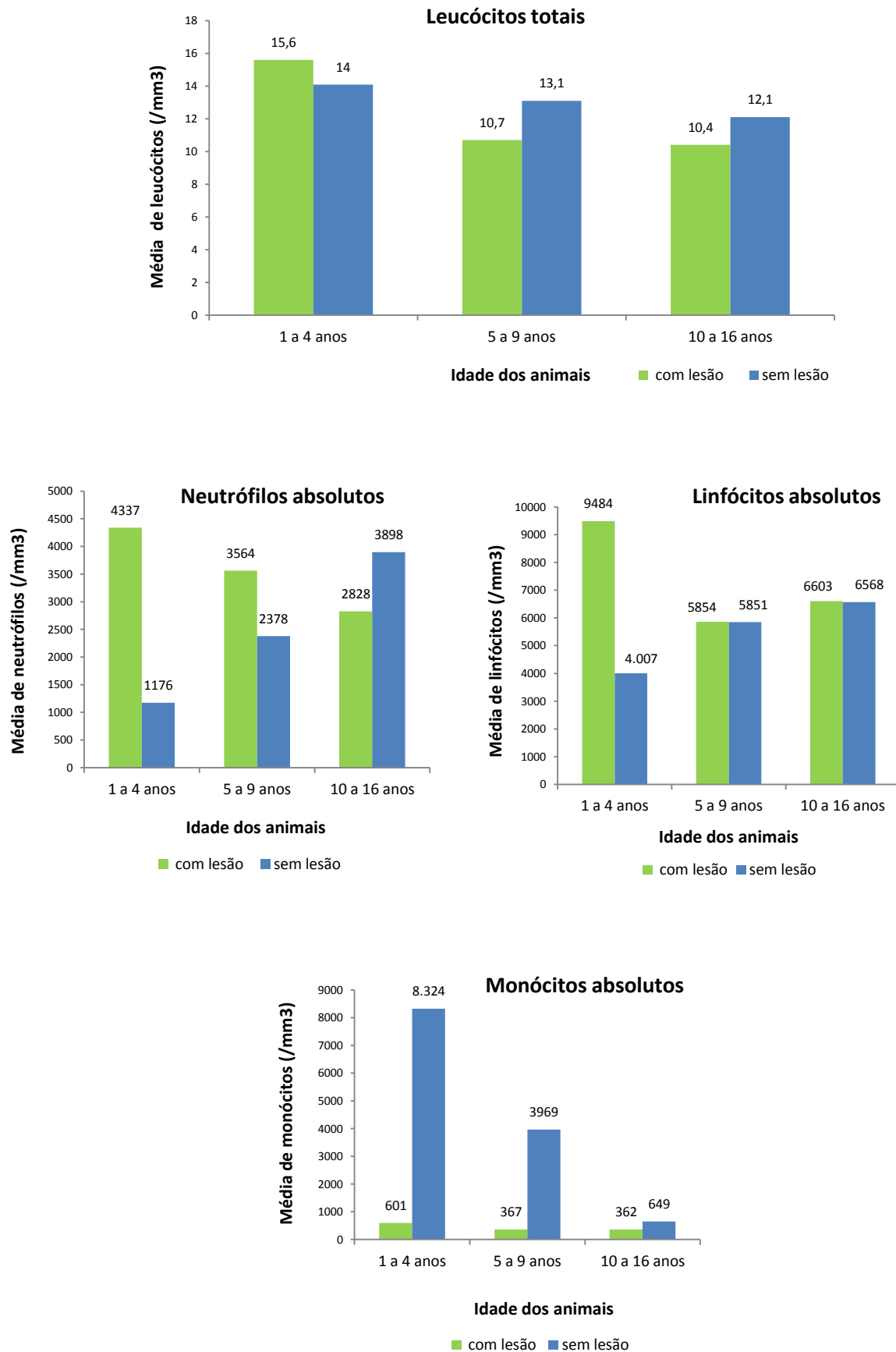


Fig. 5.

	Com lesões cutâneas (n = 39)			Sem lesões cutâneas (n = 50)			
	<u>Nº animais</u>	<u>Estro não apresentado</u>	<u>IA</u>	<u>Nº animais</u>	<u>Estro não apresentado</u>	<u>IA</u>	<u>Repetição de IA</u>
Grupo 1 a 4 anos	30	27	3	8	3	4	1
Grupo 5 a 9 anos	7	6	1	26	12	8	6
Grupo 10 a 16 anos	2	2	-	16	9	6	1

4.2 ARTIGO 2

Artigo configurado segundo as normas da revista **Transboundary Emerging Disease**.

Tipos Virais, Co-Infecção e Evolução das Lesões de Bovinos Apresentando Papilomatose Cutânea

RESUMO

A papilomatose cutânea bovina é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Papillomavirus bovino* (BPV) causando lesões conhecidas como papilomas ou verrugas em várias áreas do corpo e que aparecem principalmente em locais onde os animais sofrem atrito e pequenas contusões. A sintomatologia secundária causada pela presença das lesões leva a perdas econômicas significantes. Teve-se como objetivo avaliar rebanho bovino apresentando papilomas cutâneos quanto às características das lesões, infecção pelo BPV, frequência dos tipos virais e evolução do quadro clínico. Foram avaliadas 42 fêmeas Girolando apresentando lesões cutâneas. Os resultados demonstraram que a papilomatose cutânea leve, com lesões do tipo atípico basal único foi a mais frequente entre os animais do rebanho estudado. BPV2 e BPV3 foram os tipos virais mais frequentes, BPV11 e BPV12 foram identificados pela primeira vez em Pernambuco e a co-infecção ocorreu com vários tipos virais sem relação com localização, tipo ou a gravidade das lesões cutâneas. Não houve regressão das lesões.

Palavras-chave: BPV, regressão, doenças infectocontagiosas

INTRODUÇÃO

A papilomatose cutânea bovina é uma doença infectocontagiosa causada pelo *Papillomavirus bovino* (BPV) que acomete as células basais do epitélio e fibroblastos subepiteliais causando lesões tumorais de caráter benigno na pele e na mucosa, conhecidas como papilomas ou verrugas (Nasir e Campo, 2008; Monteiro et al., 2008; Silva et al., 2013).

O *Papillomavirus bovino* pertence à família *Papillomaviridae* composta por treze genótipos identificados e classificados em três gêneros. Gênero *Deltapapillomavirus* (BPV-1, BPV-2 e BPV-13), *Xipapillomavirus* (BPV-3, BPV-4, BPV-6, BPV-9, BPV-10, BPV-11 e BPV-12), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 e BPV-8) e o BPV-7 que ainda não está classificado em nenhum gênero (Tomita et al., 2007; Hatama et al., 2008, 2011; Zhu et al., 2012; Freitas et al., 2013; Bocaneti et al., 2014).

Estudos da epidemiologia molecular dos BPVs têm correlacionado a identificação do tipo viral com o tropismo por locais e lesões específicas (Batista et al., 2013; Bocaneti et al., 2014). Pesquisas recentes, porém, citam a presença simultânea de vários tipos de BPVs em uma mesma lesão caracterizando co-infecções (Schmitt et al., 2010; Carvalho et al., 2012; Batista et al., 2013). Estes novos achados, no entanto, ainda não determinam maiores informações como a frequência em que ocorrem as co-infecções, quais os tipos virais mais presentes, sua relação com a capacidade imune do hospedeiro, se há correlação com o desenvolvimento e intensidade do quadro clínico, entre outros fatores.

As lesões se apresentam como papilomas típicos, atípicos basais, atípicos engastados e filamentosos (Campo, 2002; Monteiro, 2008; Araldi, 2014). Apresentam coloração branca, acinzentada ou rósea, com superfície seca e cornificada, com dimensões que variam desde 1mm até 500mm (Monteiro, 2008). Aparecem mais comumente na cabeça, pescoço, barbela, membros, úbere e pênis, locais onde os animais sofrem atrito e pequenas contusões.

Segundo a literatura, regridem espontaneamente em 12 meses e afetam em sua maioria animais jovens, imunologicamente imaturos ou imunocomprometidos pelo manejo das propriedades, e animais criados de forma semi-intensiva e intensiva, sugerindo maior prevalência da doença em rebanhos e raças leiteiras (Campo, 2006). Algumas lesões podem persistir em animais submetidos a fatores estressantes, quando estas lesões podem se transformar em tumores malignos particularmente sob ação de co-fatores ambientais (Borzacchiello e Roperto, 2008; Carvalho et al., 2012).

A sintomatologia secundária causada pela presença das lesões leva a perdas econômicas e os produtores não identificam estas perdas como consequência da papilomatose cutânea fazendo com que negligenciem a presença do vírus na propriedade, principalmente em casos isolados ou animais com pequenas lesões, o que potencializa a infecção no rebanho e favorece a disseminação da doença.

Estudos continuados são necessários para maior conhecimento sobre a infecção, patogenia, doença clínica e a biologia dos vírus (Silva et al., 2012). A importância destes resultados está na contribuição com o tratamento, prevenção e controle, abrindo uma ampla discussão a respeito das estratégias vacinais, o que requer produtos com amplo espectro de cobertura, já que a imunidade induzida por BPV é tipo-específica (Nicholls e Stanley, 2000; Claus et al., 2007).

Diante do exposto, teve-se como objetivo avaliar rebanho bovino apresentando papilomas cutâneos quanto às características das lesões, infecção pelo BPV, frequência dos tipos virais e evolução clínica das lesões.

MATERIAL E MÉTODOS

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

O trabalho foi realizado no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) - Estação Experimental de Itambé - EEI, localizada na microrregião da Zona da Mata Setentrional pernambucana e no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Foram selecionadas 42 fêmeas bovinas leiteiras, apresentando papilomas cutâneos, com idade variando entre um e 16 anos da raça Girolando 5/8, provenientes do IPA - EEI, identificadas através de brincos numerados.

Os animais, criados de forma semi-intensiva, ingeriam a campo pastagens de braquiária, em piquetes limpos, livres de samambaia (*Pteridium aquilinum*), recebiam complemento no cocho em períodos de estiagem com volumoso à base de capim elefante (*Penisetum purpureum*) e cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), água e sal mineral específico para bovinos *ad libitum*. O rebanho era everminado e vacinado contra raiva, febre aftosa e brucelose. O manejo reprodutivo utilizava inseminação artificial exclusiva, sem presença de touros e a ordenha da propriedade feita de forma manual, nos turnos da manhã e tarde.

As lesões cutâneas foram analisadas por parâmetros macroscópicos, como tipo, cor, aspecto, tamanho, localização. A quantidade das lesões foi determinada pela distribuição das mesmas ao longo do corpo do animal, sendo considerada como leve (até 25% do corpo afetado), moderada (entre 25 e 50% do corpo afetado) e intensa (mais de 50% do corpo afetado). Foram avaliadas por observação e imagens fotográficas, catalogadas em fichas de acompanhamento individual e seguindo a metodologia descrita por Monteiro (2008).

Para avaliação das lesões quanto à infecção por BPV, foram coletados aleatoriamente de 16 animais 35 fragmentos de papilomas típicos, atípicos e filamentosos, em regiões do corpo animal como cabeça, dorso, membros, úbere, cauda, pescoço, barbela e ventre, por desprendimento e, quando necessário, através de biópsia em regiões previamente anestesiadas com lidocaína a 2% e incisão elíptica com lâmina de bisturi. As amostras foram acondicionadas em recipiente refrigerado e encaminhadas ao LEMTE. Foram coletadas para cada animal lesões que apresentavam tipo/características diferentes.

O DNA genômico foi extraído de fragmentos de 20mg de papilomas através do kit Wizard Genomic Purification A1125[®] seguindo as instruções preconizadas pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado utilizando-se Nanovue[®], e a qualidade aferida através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) do gene da β -globina.

Para diagnóstico da infecção por BPV e genotipagem do vírus, o DNA viral foi amplificado através de PCR utilizando Master Mix Promega Kit[®], primers BPV tipo-específico (BPV1 - BPV12, com exceção do BPV-7). Todos os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de Agarose 2% TAE corados com Brometo de Etídio e fotografados.

Os animais foram avaliados quanto à condição de infecção pelo BPV, frequência de tipos virais nas lesões cutâneas, quanto à presença de co-infecção e a relação entre os tipos virais e características da lesão. A evolução clínica das lesões foi acompanhada por um período de 24 meses.

4. RESULTADOS

O perfil da idade dos animais acompanhados e a correlação com a quantidade das lesões cutâneas encontradas estão demonstrados na Figura 1.

A papilomatose cutânea leve ocorreu em 26/42 animais (62%), moderada em 13/42 animais (31%) e intensa em 3/42 animais (7%).

- Master Mix Promega Kit[®] (Promega, Fitchburg, Estados Unidos)
- Nanovue[®] (GE, Fairfield, CT, USA)
- Wizard Genomic Purification A1125[®] (Promega, Fitchburg, Estados Unidos)

Os animais jovens de um a três anos foram os mais afetados (31/42), representando 74% dos animais acometidos. Dentre estes jovens, 19/31 (61%) apresentaram quantidade de lesões leve, 10/31 (32%) quadro de lesões moderado e 2/31 (6,5%) intenso.

O tamanho dos papilomas variou entre 0,5 a 8 cm. As lesões se apresentaram de tipos únicos ou em associação de vários tipos, algumas vezes dificultando a identificação de um tipo específico. A Figura 2 mostra os aspectos macroscópicos das lesões encontradas, identificando tipos de papilomas e associações entre eles.

O tipo atípico basal foi o mais frequente encontrado no rebanho. Na papilomatose leve, os tipos pedunculado, filamentosos e a associação de diferentes tipos de papilomas não ocorreram e os papilomas atípicos apresentaram-se únicos, pequenos (até 1cm) e distribuídos em várias partes do corpo dos animais. Na papilomatose moderada e intensa os tipos típico pedunculado, atípico basal múltiplo e a associação de tipos de papilomas foram os mais frequentes. A relação entre a intensidade das lesões e o tipo de papiloma encontrado está descrita na Figura 3.

A cor dos papilomas variou entre branco amarelado, rosado, cinza e preto.

Lesões nos membros foram encontradas com maior frequência, mas a ocorrência no úbere/tetos, cernelha/dorso, barbela e cabeça foi semelhante. Outras localizações encontradas com menor ocorrência foram linha alba, prega umbilical, cauda e sobre cicatrizes. A frequência de localização de papilomas entre os bovinos estudados está demonstrada na Figura 4.

A classificação quanto ao local de retirada, tipo de lesão, cor e identificação dos tipos virais nas 35 lesões coletadas estão demonstrados na Figura 5.

Todas as lesões apresentaram infecção por *Papillomavirus bovino*. Os tipos virais mais frequentes foram BPV2 e BPV3 que ocorreram em 100% das lesões (35/35) e o menos frequente foi BPV9 que ocorreu em 31% das lesões (11/35). Não houve predominância de tipo viral ou grupo de vírus associado ao local de ocorrência das lesões ou tipo de lesão. A relação dos BPVs encontrados está disposta na Figura 6.

A co-infecção ocorreu em todas as lesões e apresentou grupos de no mínimo cinco e no máximo nove diferentes tipos de vírus. A associação de BPVs incluindo os gêneros *Delta* e *Xi-PV* ocorreu em 34% das lesões (11/35) e a associação dos gêneros *Delta*, *Epsilon* e *Xi-PV* ocorreu em 68,5% das lesões (24/35) (Figura 7).

Em 24 meses de acompanhamento, nenhum animal (0/42) apresentou regressão com remissão das lesões e dentre os que apresentaram melhora ou agravamento, um animal (1/42, 2%), jovem, mudou a intensidade apresentada no início do estudo, passando do quadro intenso ao quadro moderado de lesões após 24 meses de observação.

Três animais (3/42, 7%) vieram a óbito. Eram jovens entre um e dois anos e apresentavam lesões intensas (um animal) e moderadas (dois animais).

5. DISCUSSÃO

Estudos de acompanhamento do quadro clínico, características e evolução das lesões causadas pelo Papillomavírus bovino não têm sido relatados, embora sejam fundamentais para compreensão da biologia do vírus, epidemiologia e controle da doença.

A partir dos resultados foi possível identificar dois quadros clínicos diferentes no rebanho. O primeiro, presente na maioria dos animais (62%), se mostrou leve, com poucas lesões, únicas, pequenas, sem predileção por área específica, muitas vezes despercebidas. O segundo quadro clínico se caracterizou mais grave e evidente, ocorreu em 16/42 animais (38%) e demonstrou todas as características clínicas relatadas na papilomatose cutânea (Campo, 2002; Nasir e Campo, 2008; Borzacchiello e Roperto, 2008).

O quadro clínico com lesões evidentes (Campo, 2006; Muro et al., 2008, Monteiro et al., 2008) é característico dos animais que desenvolvem os achados secundários de perda de peso, mastite, infecções, feridas mecânicas entre outros sintomas que geram prejuízos econômicos identificáveis pelos produtores e são os comumente isolados e descartados.

A identificação do quadro clínico leve não é relatada na literatura, sendo considerados importantes apenas os casos graves, com muitas lesões aparentes. De forma geral, nas propriedades, os animais com quadro clínico leve, apresentando uma ou duas pequenas lesões são os que permanecem no rebanho. Estes animais não chamam atenção negativa dos produtores. São livremente comercializados, atuam como reservatório disseminador da doença, e na presença de fatores estressantes, irão provavelmente apresentar agravamento das lesões.

No início do experimento, ao ser identificado em maior frequência no rebanho, foi suposto que os animais que apresentavam quadro de lesões de intensidade leve estavam no início do desenvolvimento da doença clínica causada pelo BPV. Ao longo dos 24 meses de observação, no entanto, mesmo entre jovens, citados na literatura como mais susceptíveis ao desenvolvimento da papilomatose cutânea (Monteiro et al., 2008), nenhum dos animais evoluiu a quantidade de lesões apresentadas, demonstrando que o quadro leve de lesões pode não ser um estágio da doença, mas uma condição clínica permanente causada pelo vírus BPV.

Havendo, portanto, uma indicação que os animais demonstraram uma reação à infecção, que embora tenha sido insuficiente para impedir o surgimento das lesões, em alguns casos, foi capaz de controlar o agravamento da intensidade das mesmas. Este achado pode estar relacionado à biologia viral, ou à capacidade imunológica do animal como sugerido por Nicholls e Stanley (2000).

Tendo em vista que os animais pertencem à mesma propriedade desde o nascimento, são submetidos ao mesmo tipo de manejo e condições desafiadoras, foi suposto haver uma capacidade individual na resposta imunológica frente à infecção ou que a infecção seria causada por tipos de vírus diferentes. Esta possibilidade, no entanto, foi desconsiderada já que os tipos virais encontrados nas lesões não diferiram nos animais mais ou menos afetados.

Acredita-se que o manejo da propriedade estudada, com boa oferta de colostro, higiene e alimentação adequada durante o desenvolvimento do bezerro foi determinante para estes achados. De forma geral, em propriedades leiteiras, há falha no fornecimento de colostro, oferta insuficiente de leite nos primeiros meses de vida, interrupção precoce do fornecimento, stress de manejo e higiene inadequada do ambiente e instalações, o que dificulta o estabelecimento de uma resposta imunológica mínima (Fagliari et al., 1996; Feitosa et al.; 2010; Carrazzoni et al., 2014).

O papiloma do tipo atípico basal único não ocorreu na presença de sintomatologia moderada e intensa, indicando haver uma relação entre o tipo de papiloma com a intensidade das lesões. Este achado sugere uma evolução da lesão. Surgindo como atípico engastado, semelhante a uma reação alérgica, de coloração preta com presença de pelos. Posteriormente estes pelos desaparecem dando lugar a uma superfície seca, acinzentada, circundada por pelos e que se caracteriza como papiloma atípico basal único (Figura 8). Provavelmente, posteriormente, na ausência de uma resposta imune adequada, possivelmente estas lesões se agravam surgindo lesões múltiplas.

Lesões em cicatrizes mostram que nos locais onde ocorreram lesões mecânicas como cortes e arranhões, surgiram em seguida papilomas cutâneos. Segundo Araldi (2014), papilomas em áreas sujeitas a atritos sugerem a via de infecção através do sangue, isto porque após uma micro-lesão tecidual ocorre uma infiltração leucocitária nos sítios lesionados, podendo carrear o BPV.

Os mesmos tipos de BPVs ocorreram em papilomas típicos, atípicos e filamentosos e em diferentes localizações do corpo animal. Observa-se o grupo de BPVs 2,3,4,6,8,9,10,11,12 causando papiloma do tipo pedunculado, basal e engastado em regiões como cernelha, teto e barbela. Estes achados são semelhantes aos descritos por Carvalho et al. (2012) e Batista et al. (2013) ao afirmarem que os tipos virais não estão restritos à áreas anatômicas particulares.

Poucas informações são conhecidas sobre os tipos de BPVs descritos mais recentemente (Batista et al., 2013). Entre eles, BPVs 11 e 12 foram, neste estudo, avaliados pela primeira vez em amostras no Estado de Pernambuco. A frequência encontrada mostra que os tipos virais estão disseminados no rebanho, ocorrem em lesões localizadas em várias regiões do corpo animal como cabeça, membros, tetos, barbela e pescoço e em associação com outros tipos virais.

A associação de vírus ocorreu em todas as lesões e a mais frequente incluiu os três gêneros *Delta*, *Epsilon* e *Xi-PV* demonstrando a elevada circulação de vírus, tendo em vista que em uma única propriedade foram identificados nove dos 11 tipos de BPVs testados, dentre os 13 mundialmente identificados. A co-infecção por apenas dois gêneros *Delta* e *Xi-PV* em 31% das lesões (11/35) está relacionada ao vírus BPV5 do gênero *Epsilon*, que não foi encontrado nas lesões e BPV8 que ocorreu em 24/35 lesões.

A co-infecção apresentou uma associação de muitos tipos virais e, no entanto, não está relacionada à intensidade, tipo ou localização das lesões uma vez que as mesmas associações ocorreram em animais com papilomatose leve, moderada e intensa, em vários locais do corpo e em todos os tipos de papilomas, incluindo o atípico basal único, mais frequente nos animais pouco acometidos.

Este achado demonstra que existe no rebanho um grupo de vírus circulante entre os animais, os quais estão em contato direto ou indireto constante, como consequência do manejo, o que permite as infecções ao longo do tempo (Nicholls e Stanley, 2000).

A co-infecção é particularmente importante quando relacionada ao tratamento e prevenção da doença. A produção de tratamentos específicos, como os homeopáticos assim como o desenvolvimento de vacinas, requer um amplo espectro de cobertura. Conhecer e utilizar o maior número de tipos de BPVs presentes no rebanho é fundamental para o tratamento e controle (Carvalho et al., 2012; Araldi et al., 2013, 2014).

Estudos anteriores definem a papilomatose cutânea como autolimitante com regressão total das lesões, na ausência de co-fatores ambientais, ao final do primeiro ou segundo ano de vida do animal (Campo, 2006). No entanto, neste estudo não houve regressão com remissão das lesões em nenhum dos animais de diferentes faixas etárias. Este achado sugere alterações na patogenia da doença. Vários fatores podem estar associados como a multiplicidade de vírus causando sucessivas novas re-infecções, infecções latentes, resposta imune celular defeituosa ou condições imunossupressoras, cada vez mais presentes devido às necessidades da produção (Nicholls e Stanley, 2000).

A identificação de apenas um animal com atenuação das lesões sugere uma condição individual que, no entanto, não pode ser generalizada ao rebanho e à papilomatose cutânea. Esta consideração difere da literatura acerca da doença, que cita a regressão total das lesões, em média, 24 meses após o aparecimento das mesmas. As lesões, no entanto, não regridem totalmente. Algumas vezes, há diminuições na quantidade, principalmente os papilomas maiores e aglomerados, permanecendo os menores e individuais (Carrazzoni, dados não publicados).

Estudos recentes com a evolução do quadro clínico de bovinos apresentando papilomatose cutânea não são encontrados na literatura, sobretudo em períodos de tempo acima de seis meses e com grande número de animais. Por serem dispendiosos, os

experimentos comumente utilizam pequeno número de animais, que são acompanhados por variável espaço de tempo e, em sua maioria, a infecção pelo BPV é produzida artificialmente com carga e tipos virais controlados. Estes fatores podem justificar a dissonância dos achados deste estudo com a literatura. Por outro lado, atualmente são conhecidos tipos e variantes dos BPVs que podem ser inúmeros (Araldi et al, 2014; Batista et al., 2013) e apresentar virulência diferenciada, os rebanhos vêm sendo cruzados e alterados geneticamente, o clima, parasitos, alimentação e o manejo tem sido modificados havendo uma pressão pela elevada produção e todas estas mudanças podem também ter contribuído com alterações na biologia viral e o curso da papilomatose cutânea bovina.

A baixa mortalidade encontrada está de acordo com a citada na literatura e atribui o óbito a casos em que o número de papilomas é elevado, estão situados em áreas como boca, esôfago e partes do trato respiratório superior, dificultando ou impedindo a alimentação e respiração do animal ou na presença de co-fatores ambientais levando as lesões à malignidade (Borzacchiello e Roperto, 2008).

5. CONCLUSÃO

A papilomatose cutânea leve, com lesões do tipo atípico basal único é a mais frequente entre os animais do rebanho estudado.

Existe um grupo de vírus circulantes no rebanho no qual BPV2 e BPV3 são os mais frequentes. BPV11 e BPV12 foram identificados pela primeira vez em Pernambuco, em diversas áreas do corpo animal e em associação com outros vírus.

A co-infecção ocorre com vários tipos virais sem relação com localização, tipo ou a gravidade das lesões cutâneas.

Não houve regressão e cura nos animais acompanhados, e a atenuação das lesões ocorreu em um animal.

6. REFERÊNCIAS

Araldi R. P., Carvalho, R. F., Melo, T. C., Diniz, N. S. P., Sant'Ana, T. A., Mazzuchelli-de-Souza, J., Spadacci-Morena, D. D., Beçak, W., Stocco, R. C., 2014. Bovine Papillomavirus in the beef cattle: first description of BPV-12 and putative type BAPV8 in Brazil. *Gen. Mol. Res.* 13 (3), 5644-5653.

Araldi R. P., Melo, T. C., Diniz, N. S. P., Carvalho, R. F., Beçak, W., Stocco, R. C., 2013: Bovine Papillomavirus clastogenic effect analyzed in comet assay. *Biomed. Res. Int.* 2013, 1-7.

Batista, M.V., M. A. Silva, N. E. Pontes, M. C. Reis, A. Corteggio, R. S. Castro, G. Borzacchiello, V. Q. Balbino, and A. C. Freitas, 2013: Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. *Vet. J.* 197, 368–373.

Bocaneti, F., Altamura, G., Corteggio, A., Velescu, E., Roperto, F., Borzacchiello, G. 2014: Bovine Papillomavirus: New Insights into na Old Disease. *Transbound. Emerg. Dis.*, <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12222>.

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

Campo M.S., 2002: Animal model of papilomavírus pathogenesis, *Virus Res.* 89:249–261.

Campo M.S. 2006: Bovine Papillomavirus: Old System, New Lessons? In: *Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccine and Beyond* (Campo MS, ed.). Caister Academic Press, Scotland, 373-383.

Carrazzoni, P.G., Tenório Filho, F., Coelho, M.C.C. 2014: Avaliação do manejo de bezerros neonatos e sua influência na transferência de imunidade passiva. Anais Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/site/conbravet2014/mensagem.htm> (acessado em 20/04/2015).

Carvalho, C.C.R., Batista, M.V.A., Silva, M.A.R., Balbino, V.Q., Freitas, A.C., 2012: Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 441–447.

Claus, M.P., Vivian, D., Lunardi, M., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2007: Análise filogenética de papilomavírus bovino associado com lesões cutâneas em rebanhos do Estado do Paraná. *Pesq. Vet. Bras.*, 27, 314–318.

Fagliari, J. J., Oliveira, E. C., Pegorer, M. F., Ferrante, L. C., & Campos Filho, E., 1996: Relação entre o nível sérico de gamaglobulinas e as atividades de gamaglutamiltransferase, fosfatase alcalina e aspartato aminotransferase de bezerros recém-nascidos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, 48, 105-112.

Feitosa, F. L., Camargo, D. G., Yanaka, R., Mendes, L. C., Peiró, J. R., Bovino, F., Gasparelli, E. R., 2010: Índices de falha de transferência de imunidade passiva (FTIP) em bezerros holandeses e nelores, as 24 e 48 horas de vida: valores de proteína total, de gamaglobulina, de imunoglobulina G e da atividade sérica de gamaglutamiltransferase, para o diagnóstico de FTIP. *Pesq. Vet. Bras.* 30(8), 696-704.

Freitas, A.C, Silva, M.A.R., Carvalho, C.C.R., Birgel, Jr.E.H., Santos, J.F., Beçak, W., Stocco dos Santos, R.C., 2007: Papillomavirus DNA detection in non-epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus, in Mendez-Villas, A. (Eds.), *Comm. Curr. Res. and Educ. Top. Trends Appl. Microb.* 1: 697-704.

Freitas, A.C., Carvalho, C., Brunner, O., Birgel, Junior E. H., Dellalibera, A.M.M.P., Benesi, F. J., Gregory, L., Beçak, W., Stocco dos Santos, R.C., 2003: Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Braz. J. Microbiol.* 34, 76–78.

Freitas, A.C., Mariz, F.C., Silva, M.A., Jesus A.L., 2013: Human papillomavirus vertical transmission: review of current data. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1451–1456.

Hatama, S., Ishihara, R., Ueda, Y., Kanno, T., Uchida, I., 2011: Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using Xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. *Arch. Vir.* 156, 1281–1285.

Hatama, S., Nobumoto, K., Kanno, T., 2008. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *Journal of General Virology* 89, 158–163.

Monteiro, V. L. C., Coelho, M. C. O. C., Carneiro, A. S., Silva, R. F. A. A. 2008. Descrição clínica e histopatológica da papilomatose cutânea bovina (BPV). *Ciênc. Anim. Bras.* 9, 1079-1088.

Muro, L. F. F., Bottura, C. R. P., Piccinin, A. 2008: Papilomatose Bovina. *Rev. Cient. Eletr. Med. Vet.*, 10, 1679-7353.

Nasir, L., Campo, M. S., 2008: Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids, *Vet. Dermat.*, 19, 243-254.

Nicholls, P. K. e Stanley, M. A., 2000: The immunology of animal papillomaviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 73, 101-127.

Schmitt, M., Fiedler, V., Muller, M., 2010: Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPV genotyping assay. *J. Virol. Methods* 170: 67-72.

Silva, M.A.R., Silva, K.M.G., Jesus, A.L.S., Barros, L.O., Corteggio, A., Altamura, G., Borzacchiello, G., Freitas, A.C., 2013: The presence and gene expression of bovine papillomavirus in the peripheral blood and semen of healthy horses. *Transbound. Emerg. Dis.* <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12036>.

Tomita, Y., Literak, I., Ogawa, T., Jin, Z., Shirasawa, H., 2007: Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes* 35, 243–249.

Yagui, A., C. Carvalho, A. C. Freitas, L. G. B. Goes, M. L. Z. Dagi, E. H. Birgel Jr, W. Beck, and R. C. Stocco dos Santos, 2006: Papillomatosis in cattle: in situ detection of bovine papillomavirus DNA sequences in reproductive tissues. *Braz. J. Morphol. Sci.* 23, 525–529.

Zhu, W., Dong, J., Shimizu, E., Hatama, S., Kadota, K., Goto, Y., & Haga, T., 2012: Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. *Arch. Virol.*, 157, 85-91.

Figura 1. Idade dos animais e quantidade de lesões cutâneas em bovinos naturalmente infectados por BPV - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.

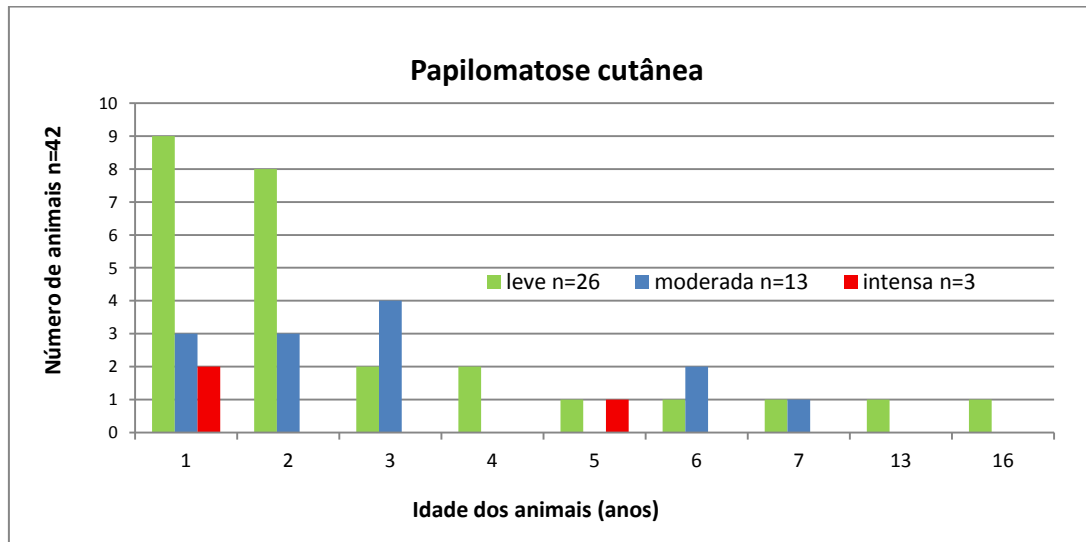


Figura 2. Aspectos macroscópicos das lesões papilomatosas observadas. A - papilomas filamentosos localizados no teto, com aspecto fibroso. B - papilomas do tipo típico pedunculado. C - papiloma atípico engastado. D - papiloma atípico basal, com aspecto achatado. E - associação de vários tipos de papilomas. F - papilomas recobrendo grande extensão de pele. Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.

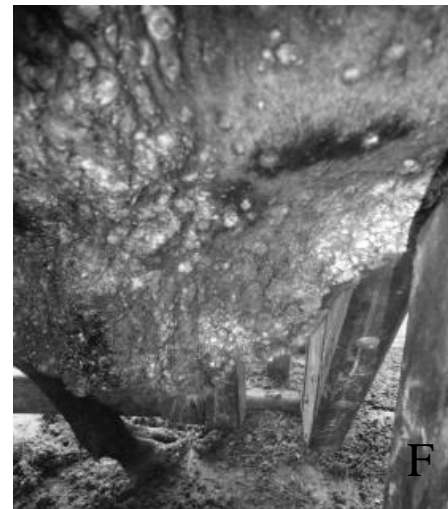
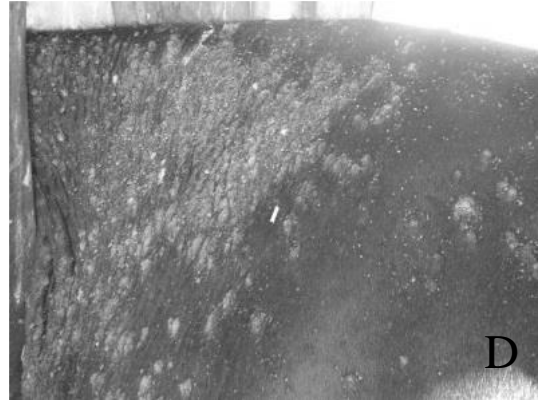


Figura 3. Frequência dos tipos de lesões cutâneas em papilomatose leve, moderada e intensa em bovinos naturalmente infectados por BPV - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.

Intensidade	Nº de animais	tipico				associação
		pedunculado	atípico basal	atípico engastado	filamentoso	de tipos (misto)
leve	26	0	26*	8	0	0
moderada	13	10	10**	4	4	9
intensa	3	3	3**	0	1	3
Total animais	42	13	39	12	5	12

*únicos **múltiplos

Figura 4. Localização de lesões cutâneas em bovinos naturalmente infectados por BPV - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.

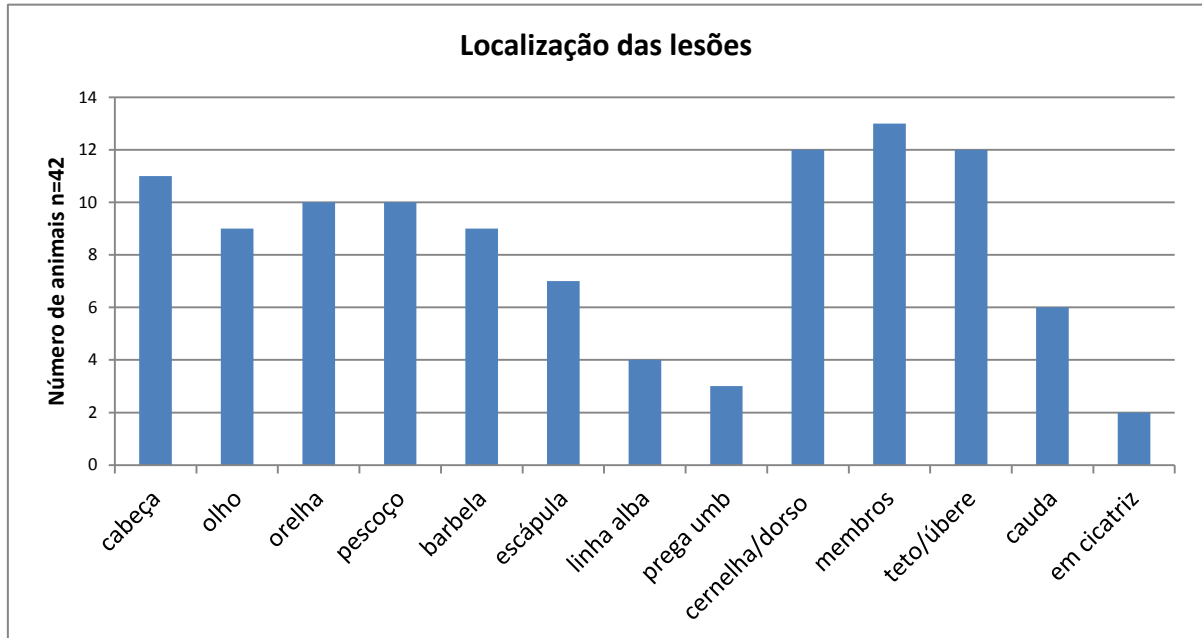


Figura 5. Aspectos macroscópicos, localização e tipos de BPV em lesões cutâneas de bovinos leiteiros - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.

Localização	Tipo da lesão	Cor	BPV	Agrupamento Filogenético
orelha	típico pedunculado	cinza	2,3,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
olho	típico pedunculado	cinza	2,3,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
pescoço	típico pedunculado	cinza	2,3,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
pescoço	típico pedunculado	branca	2,3,4,6,8,9,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
pescoço	atípico basal	cinza	2,3,4,8,9,10	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
cabeça	típico pedunculado	branca	2,3,4,8,9,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
cabeça	típico pedunculado	cinza escuro	2,3,4,6,10,11,12	Delta-PV, Xi-PV
cabeça	atípico basal	branca	2,3,4,6,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
cabeça	atípico basal	cinza escuro	2,3,4,8,9,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
membro	atípico basal	branca	2,3,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
teto	filamentoso	rosa	2,3,4,6,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
teto	típico pedunculado	branca	2,3,4,6,10,11,12	Delta-PV, Xi-PV
teto	típico pedunculado	cinza escuro	2,3,4,6,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
teto	típico pedunculado	cinza escuro	2,3,4,6,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
teto	típico pedunculado	branca	2,3,4,6,8,9,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
teto	típico pedunculado	branca	2,3,6,8,9,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
teto	típico pedunculado	branca	2,3,4,6,10,11,12	Delta-PV, Xi-PV
teto	atípico basal	branca	2,3,4,6,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
teto	típico pedunculado	cinza escuro	2,3,4,6,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
teto	típico pedunculado	branca	2,3,4,6,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
teto	típico pedunculado	cinza escuro	2,3,6,11,12	Delta-PV, Xi-PV
prega umbilical	típico pedunculado	branca	2,3,4,6,10,11,12	Delta-PV, Xi-PV
barbela	típico pedunculado	cinza escuro	2,3,4,6,10,11,12	Delta-PV, Xi-PV
barbela	típico pedunculado	cinza escuro	2,3,4,6,10,11,12	Delta-PV, Xi-PV
barbela	típico pedunculado	branca	2,3,4,6,8,9,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
barbela	atípico basal	cinza escuro	2,3,4,6,9,10,11	Delta-PV, Xi-PV
cernelha	atípico engastado	cinza escuro	2,3,4,6,9,10,11,12	Delta-PV, Xi-PV
cernelha	atípico engastado	cinza escuro	2,3,4,6,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
cernelha	atip engastado	preto	2,3,4,6,8,9,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
cauda	atípico basal	cinza escuro	2,3,4,6,10,11,12	Delta-PV, Xi-PV
costela	atípico basal	cinza escuro	2,3,4,6,8,10,11	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
costela	atípico basal	cinza	2,3,4,6,8,9,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
linha alba	típico pedunculado	cinza escuro	2,3,4,6,10,11,12	Delta-PV, Xi-PV
escápula	atípico basal	cinza escuro	2,3,4,6,8,10,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV
escápula	atípico engastado	preto	2,3,4,6,8,11,12	Delta-PV, Epsilon-PV, Xi-PV

Figura 6. Frequência dos tipos de BPVs encontrados em lesões cutâneas de fêmeas bovinas leiteiras - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.

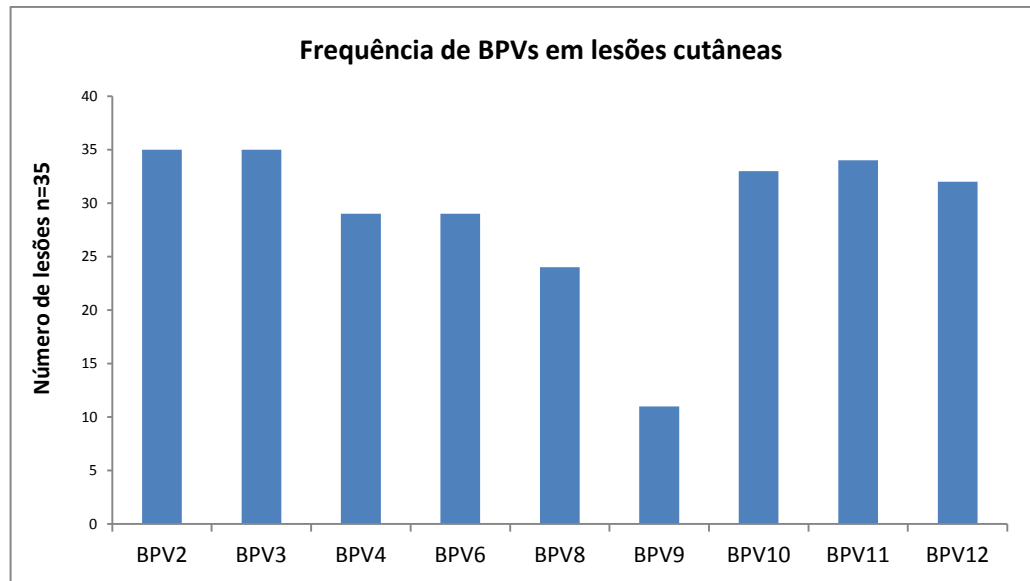


Figura 7. Co-infecção em lesões cutâneas por BPVs agrupados filogeneticamente - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.

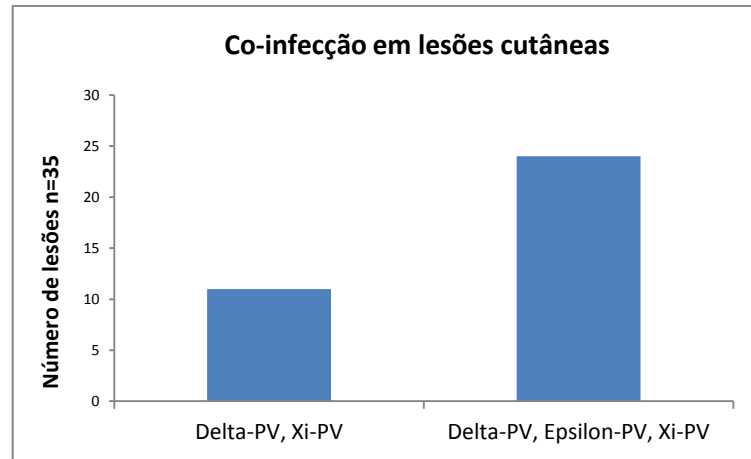
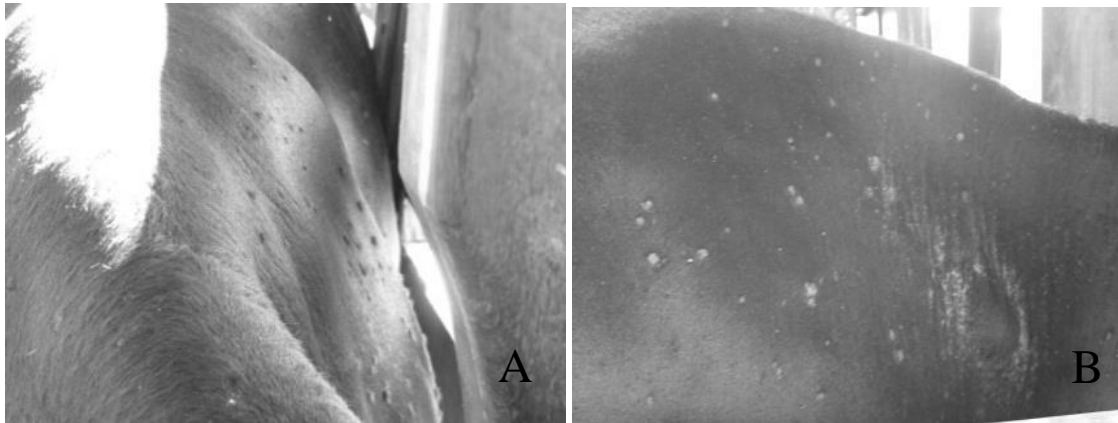


Figura 8. Tipos de papilomas característicos da papilomatose cutânea leve. A - papiloma atípico engastado, semelhante a uma reação alérgica, com presença de pelos e B - papilomas atípicos basais únicos. - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco – Brasil (2015). Carrazzoni et al, 2015.



4.3 ARTIGO 3

Artigo configurado segundo as normas da revista **Transboundary Emerging Disease**.

SANGUE E LESÕES DE ANIMAIS SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS INFECTADOS POR PAPILLOMAVÍRUS BOVINO

RESUMO

A presença de *Papillomavírus Bovino* (BPV) em diferentes tecidos e fluidos corpóreos como sangue, plasma, leite, colostro, placenta, líquido amniótico, gametas e órgãos reprodutivos, sugere outros meios de infecção e a possibilidade de transmissão vertical e horizontal. BPVs são encontrados na pele íntegra de animais aparentemente saudáveis e em leucócitos circulantes sendo considerados outro sítio de latência, com relevante papel no estudo da doença. Neste contexto, teve-se como objetivo avaliar a presença e tipos virais de BPV no sangue e lesões de rebanho bovino leiteiro, e correlacionar esses achados ao desenvolvimento de lesões cutâneas. Foram acompanhadas 92 fêmeas bovinas leiteiras, apresentando ou não papilomas cutâneos, das quais foram analisadas 89 amostras sanguíneas e, de 16 animais, foram avaliadas 35 lesões cutâneas. A prevalência da infecção por BPV em animais assintomáticos é elevada e pode ser diagnosticada através da identificação viral no sangue. Os tipos virais presentes no sangue e lesões do rebanho são semelhantes, não diferem entre animais sintomáticos e assintomáticos, e a co-infecção não é determinante para o desenvolvimento de lesões cutâneas.

Palavras-chave: BPV, co-infecção, tipos virais

INTRODUÇÃO

A papilomatose está amplamente difundida no rebanho bovino brasileiro e seu agente etiológico, o *Papillomavírus Bovino* (BPV) é adquirido diretamente por inoculação cutânea ou através de soluções de continuidade da pele por contato direto entre animais infectados ou de forma indireta através de objetos contaminados (Wosiacki, 2005).

BPVs são responsáveis por causar papilomas ou verrugas cutâneas, tumores na bexiga e trato digestivo (Borzacchiello e Roperto, 2008), que podem regredir espontaneamente ou tornarem-se malignos, especialmente quando associados a co-fatores ambientais (Bocanetti et al., 2014). As várias formas de doença causadas pelos vírus são de importância clínica e econômica mundial, para rebanhos de corte e leiteiro (Rocío et al., 2012).

A presença de BPVs em diferentes tecidos e fluidos corpóreos como sangue, plasma, leite, colostro, placenta, líquido amniótico, gametas e órgãos reprodutivos, sugere outros meios de infecção e a possibilidade de transmissão vertical (Stocco dos Santos et al., 1998;

Freitas et al., 2003, 2007; Lindsey et al., 2009; Roperto et al., 2012). A transmissão através de vetores como insetos e artrópodes também está relatada (Finlay et al., 2009).

BPVs são encontrados na pele íntegra de animais aparentemente saudáveis, sem sinais ou sintomas da doença mostrando a pele como sítio de latência do vírus (Borzacchiello et al., 2003). Leucócitos circulantes também abrigam BPVs na forma episomal sendo considerados outro sítio de latência com relevante papel no estudo da doença (Freitas et al., 2003; Silva et al., 2012).

Os vírus em infecção latente permanecem no tecido e podem, na ocorrência de traumas que lesem a pele ou, quando os animais são submetidos a fatores imunossupressores, levar à formação de papilomas nos animais aparentemente saudáveis (Silva et al., 2013).

Estão descritos atualmente na literatura 13 tipos de BPVs e supostos novos tipos vem sendo estudados (Freitas et al., 2011; Bocanetti et al., 2014). A co-infecção em lesões está relatada assim como em amostras sanguíneas, no entanto, pouco é conhecido a respeito da importância clínica da presença de múltiplos tipos virais nas lesões e, sobretudo, no sangue (Schmitt et al., 2010; Freitas et al., 2011; Carvalho et al., 2012; Batista et al., 2013; Santos et al., 2014). Como a imunidade induzida por BPV é tipo-específica, o estudo dos tipos virais e sua frequência são necessários ao conhecimento da epidemiologia, patogenia, tratamento e controle da doença (Araldi et al., 2014).

O diagnóstico e tipificação de BPVs no sangue podem auxiliar na pesquisa de vacinas e outros tratamentos, tornam mais prático o diagnóstico no rebanho e deve ser investigado já que o sangue é um disseminador potencial do vírus (Roperto et al., 2011; Silva et al., 2013). Neste contexto, teve-se como objetivo avaliar a presença e tipos virais de BPV no sangue e lesões de rebanho bovino leiteiro, e correlacionar esses achados à condição clínica sintomática e assintomática apresentada pelos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

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

O trabalho foi realizado no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) - Estação Experimental de Itambé - EEI, localizada na microrregião da Zona da Mata Setentrional pernambucana e no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco.

Foram acompanhadas 92 fêmeas bovinas leiteiras, apresentando ou não papilomas cutâneos, com idade variando entre 1 e 16 anos, da raça Girolando 5/8, provenientes do IPA - EEI, identificadas através de brincos numerados, criadas em piquetes de Braquiárias, livres de samambaia (*Pteridium aquilinum*).

Para avaliação de lesões quanto à infecção por BPV foram coletados de 16 animais 35 fragmentos de papilomas cutâneos por desprendimento e quando necessário, através de biópsia em regiões previamente anestesiadas com lidocaína a 2% e incisão elíptica com lâmina de bisturi. As amostras foram acondicionadas em recipiente refrigerado e encaminhadas ao LEMTE. Foram coletados tipos e locais diferentes de papilomas para os animais estudados.

Amostras de sangue foram colhidas de 89 animais através de venopunção da jugular em tubos tipo “vacutainer” contendo EDTA para extração de DNA e genotipagem do vírus.

O DNA genômico sanguíneo foi extraído de uma alíquota de 200µL da amostra contendo anticoagulante, através do kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha) e o DNA genômico dos papilomas foi extraído de fragmentos de 20mg de tecido através do kit Wizard Genomic Purification A1125 (Promega, Fitchburg, Estados Unidos) ambos seguindo as instruções preconizadas pelo fabricante.

O DNA extraído foi quantificado utilizando-se Nanovue (GE, Fairfield, Estados Unidos), e a qualidade aferida através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) do gene da β-globina como descrito por Freitas et al. (2003).

Para diagnóstico da infecção por BPV e genotipagem do vírus, o DNA viral foi amplificado através de PCR utilizando Master Mix Promega Kit (Promega, Fitchburg, Estados Unidos), primers BPV tipo-específico (BPV1 - BPV12, exceção BPV7), conforme descrito por Silva et al.(2003). Todos os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de Agarose 2% TAE corados com Brometo de Etídio e fotografados.

Os animais foram avaliados quanto à condição de infecção pelo BPV no sangue e nas lesões cutâneas, frequência de tipos virais, presença de co-infecção e a relação entre a infecção, os tipos virais e desenvolvimento de lesões.

RESULTADOS

Todos os animais avaliados 92/92 (100%) estavam infectados pelo Papillomavirus Bovino (BPV) tanto nas amostras sanguíneas (89/89) quanto nas lesões coletadas (35/35).

O perfil da idade dos animais estudados demonstrou que jovens de um a três anos foram mais afetados clinicamente e que 50/89 (56%) animais, incluindo jovens de 1 a 3 anos, mostraram-se infectados, porém não desenvolveram lesões cutâneas (Fig.1).

Vírus dos gêneros Delta, Epsilon e Xi-PV foram detectados nas amostras de lesões coletadas. Delta e Xi-PV foram os mais frequentes (35/35) e Epsilon-PV ocorreu em 24/35. Nove dos onze tipos de BPV incluídos no estudo foram detectados em amostras de lesões cutâneas. BPVs 2 e 3 foram os tipos virais mais frequentes (35/35), BPV 9 o menos frequente (11/35) e os BPVs 1 e 5 não foram identificados. Os BPVs 11, 10 e 12 estiveram presentes em 34/35, 33/35 e 32/35 amostras respectivamente (Fig. 2).

Os vírus dos gêneros Delta e Xi-PV foram detectado em amostras de sangue coletadas e Xi-PV foi o mais frequente (89/89). Dos tipos de BPV testados no estudo, nove foram detectados nas amostras de sangue. BPV 10 foi o tipo viral mais frequente (88/89) seguido do BPV 12 (83/89) e BPV 9 (81/89). Os BPVs 3 (1/89) e 4 (7/89) foram os menos frequentes e os BPVs 5 e 8 não foram identificados (Fig. 3).

A presença de múltiplos vírus nas lesões foi observada em todas as amostras 35/35 (100%), com no mínimo cinco diferentes tipos de BPVs e no máximo apresentando 9 tipos de BPVs. A co-infecção das amostras de lesões cutâneas está demonstrada na Figura 4, onde se observa a ocorrência de múltiplos vírus agrupados. Os vírus do gênero Xi-PV ocorreram em 35/35 lesões, a associação dos vírus dos gêneros Delta e Xi-PV ocorreram em 35/35 lesões, dos gêneros Delta e Epsilon-PV, Epsilon e Xi-PV e a associação dos três diferentes gêneros em 24/35 lesões.

As amostras sanguíneas apresentaram co-infecção em 87/89 (98,8%) amostras com no mínimo 2 tipos virais e no máximo 8 associações de vírus. Os vírus do gênero Delta-PV

ocorreram em 53/89 amostras, os vírus do gênero Xi-PV ocorreram em 87/89 amostras e a associação dos vírus do gênero Delta e Xi-PV em 82/89 amostras sanguíneas (Fig.5.).

Para os 16 bovinos sintomáticos, dos quais foram coletadas amostras de papilomas cutâneos, foi avaliada a frequência de tipos virais no sangue e nas lesões. BPV 1 ocorreu exclusivamente no sangue, BPVs 4, 6 e 8 ocorreram exclusivamente nas lesões e os BPVs 3 e 11 ocorreram nas lesões de 16/16 animais e no sangue de 1/16 animais (Fig. 6).

Na Figura 7 está demonstrada a frequência dos tipos de BPVs encontrados em amostras de sangue de animais sintomáticos e assintomáticos. A frequência de tipos virais nos animais sintomáticos e assintomáticos foi semelhante para os BPVs, diferindo para os BPVs 3 e 6. Observa-se que os BPVs 1, 2, 4, 9, 10, 11 e 12 ocorreram nos animais com e sem lesão, BPV 3 em um animal com lesão e BPV6 em oito animais sem lesão.

A Fig.8 demonstra a frequência da co-infecção em animais sintomáticos e assintomáticos. Todos os animais que apresentavam lesões cutâneas apresentaram co-infecção (39/39) e 49/50 dos animais sem lesões ou sintomas da doença apresentaram co-infecção.

DISCUSSÃO

A alta prevalência do Papillomavirus Bovino é descrita em todo o mundo e em várias regiões do Brasil (Freitas et al., 2011, Bocaneti et al., 2014). Neste estudo, todas as amostras avaliadas apresentaram-se infectadas pelo BPV demonstrando 100% de infecção nos animais estudados, mesmo nos assintomáticos, sugerindo que a infecção pelo Papillomavirus Bovino no rebanho brasileiro pode superar os 60% estimado por Catroxo et al. (2013).

Animais jovens são mais acometidos pela doença clínica causada pelo Papillomavirus Bovino embora adultos apresentando lesões de pele ocorram com frequência como descrito por Monteiro et al. (2008). O desenvolvimento de lesões nos animais infectados pode estar relacionado à incapacidade do sistema imune em debelar a infecção, à presença de desafio constante e a fatores do manejo, depressores do sistema imunológico (Silva, 2004, Monteiro, 2008, Rocio, 2012). Como os animais pertenciam à mesma propriedade, portanto submetidos às mesmas condições de manejo e em contato direto, acredita-se que a competência imunológica individual foi determinante para o desenvolvimento do quadro cínico.

A alta prevalência da infecção (56%) em animais assintomáticos é dado importante para a epidemiologia do vírus e para os veterinários de campo. Estes animais, aparentemente saudáveis, carregam no sangue os vírus e podem, além de desenvolver lesões quando desafiados imunologicamente, serem agentes de transmissão do vírus na propriedade, em feiras agropecuárias, e mesmo para outros rebanhos, quando comercializados.

A elevada diversidade de BPVs nas lesões cutâneas e em amostras sanguíneas foi demonstrado por Carvalho et al. (2012) e Santos et al. (2014) em mais de uma propriedade nos Estados da Bahia e Pernambuco. Neste estudo, observa-se a ocorrência de 10 tipos virais em uma única propriedade, uma fazenda experimental com todos os aspectos produtivos controlados em que se conhece o histórico do rebanho e não há trânsito de animais na propriedade, demonstrando a elevada disseminação do vírus e ressaltando a possibilidade de transmissão por outras vias como através de moscas, carrapatos e por meio reprodutivo.

Múltiplos mecanismos evolucionários como replicação intra-hospedeiro, recombinação e adaptação explicam a diversidade de BPVs (Gottschiling et al., 2011; Freitas et al., 2011) embora, comparando-se com o Papillomavirus Humano (HPV), exista a expectativa da existência de muitos outros tipos virais e que mais amostragens no rebanho bovino precisam ser realizadas (Claus et al., 2009; Silva et al., 2010; Araldi et al., 2014).

A frequência dos tipos virais nas lesões foi similar entre os BPVs 2, 3, 10, 11 e 12. A incidência de BPV2 e 3 foi relatada por Monteiro et al. (2008), Carvalho et al. (2012) e Batista et al. (2013) em diferentes propriedades de Pernambuco demonstrando que o rebanho estudado reflete a ocorrência do vírus no Estado. Estes achados, no entanto, diferem parcialmente de Schmitt et al. (2010) que encontraram BPV 8, 1 e 10 como mais frequentes em amostras de lesões cutâneas na Alemanha, confirmando que a prevalência de tipos virais varia entre regiões.

Este estudo descreve a primeira detecção dos BPVs 11 e 12 no sangue de bovinos em Pernambuco e no Nordeste brasileiro, em animais sintomáticos, assintomáticos e associados a outros tipos virais. Em lesões cutâneas, Carrazzoni et al. (dados não publicados) demonstraram a presença destes tipos virais em lesões cutâneas de fêmeas bovinas leiteiras de Pernambuco.

BPV1 tem sido pouco identificado em lesões cutâneas de bovinos no Nordeste brasileiro (Carvalho et al., 2012; Silva et al., 2012; Batista et al., 2013). O vírus, entretanto,

circula no rebanho estudado, uma vez que embora não identificado nas amostras de lesões coletadas, esteve presente em 59/89 amostras de sangue avaliadas. A baixa ocorrência de BPV1 pode estar associada a diversos fatores como desenvolvimento de resposta imune dos animais impedindo o desencadeamento de lesões, linhagem menos virulenta na região, ou ao fato da maior parte dos estudos com BPV1 serem associados à ocorrência do *Pteridium aquilinum* (samambaia) o que poderia potencializar a patogênese do vírus, e que não é o caso deste estudo nem dos anteriormente descritos. São especulações, que, no entanto, precisam ser investigadas.

Ao contrário de BPV 1, BPV 5 parece não estar presente no rebanho por não ter sido identificado na lesões nem no sangue dos 89 animais avaliados. Estudos anteriores na região demonstram baixa frequência de BPV 5 em lesões cutâneas, o que se assemelha aos nossos achados (Batista et al., 2013).

A presença de co-infecção em uma mesma lesão foi descrita por vários grupos de estudo no Brasil e em outros países (Ogawa et al., 2004; Yagui et al., 2006; 2008; Lindsey et al., 2009; Claus et al., 2009; Pangty et al., 2010; Schmitt et al., 2010; Carvalho et al., 2012; Silva et al., 2012; Batista et al., 2013). O papel dos vários tipos de BPV nas lesões não está esclarecido. Em nossos resultados observa-se que a presença de múltiplos vírus ocorre em todas as lesões, por vírus dos três diferentes gêneros, sem predominância, sugerindo que não há formação de um grupo viral específico, mais patogênico, responsável pelas lesões. Entretanto, novas avaliações precisam ser realizadas para saber se todos os tipos virais presentes estão ativos nas lesões.

Da mesma forma, no sangue, a ocorrência de múltiplos vírus ocorreu em quase todas as amostras (88/89) e quando comparados os tipos virais em animais com e sem lesão, observou-se que os BPVs são os mesmos e que a co-infecção não é determinante para o desenvolvimento de lesões, visto que está presente em animais sintomáticos e assintomáticos.

Batista et al. (2013) sugerem a co-infecção como causa de imunossupressão e consequente persistência de infecções e lesões no rebanho. No entanto, como a co-infecção ocorre em animais com e sem lesões parece haver mais fatores determinantes da imunossupressão responsáveis pela persistência da infecção. A capacidade imune do hospedeiro, e a atividade e número de cópias do vírus são provavelmente os fatores mais importantes para o desencadeamento da sintomatologia (Silva et al., 2013).

A identificação de nove diferentes tipos de BPVs no sangue dos animais, semelhante à diversidade de vírus encontrada nas lesões, mostra a relevância do sangue na patogenia e epidemiologia da doença (Freitas et al., 2007). Roperto et al., (2011) e Silva et al. (2014) demonstraram a expressão de BPV no sangue de animais sintomáticos e assintomáticos, sugerindo que leucócitos mononucleares carregam o vírus na corrente sanguínea e que o sangue é uma potencial forma de infecção e disseminação do vírus (Freitas et al., 2007; Roperto et al., 2008; 2011; Santos et al., 2014; Araldi et al., 2014).

A presença de BPV 4, 6 e 8 exclusivamente nas lesões e a alta frequência de BPV3 e BPV11 nas lesões com baixa frequência no sangue dos 16 animais, sugere que os BPVs migram das lesões para o sangue, embora o contrário também possa ocorrer. Os achados dos animais avaliados mostra que para alguns tipos virais esta migração ainda não havia ocorrido, portanto, alguns tipos virais foram encontrados nas lesões e estavam ausentes no sangue. Sugere-se também que possa ocorrer um período sem vírus circulantes no sangue ou que uma baixa frequência do vírus no sangue do animal ou na amostra coletada dificulte sua identificação.

Freitas et al., 2007 e Roperto et al., (2011) sugerem a disseminação de BPV através do sangue para vários órgãos do corpo animal, o que sob o ponto de vista clínico e prático das propriedades é mais relevante como via de contaminação do que o contato direto e indireto com lesões e superfícies infectadas, sobretudo ao se considerar a infecção do trato reprodutivo de fêmeas, e principalmente dos machos. A possibilidade de disseminação do vírus através do sangue e meio reprodutivo é muitas vezes superior à possibilidade de contaminação através de contato direto e indireto com superfícies contaminadas.

Como meio diagnóstico, a similaridade dos tipos virais encontrados no sangue e nas lesões abre o leque de opções diagnósticas do BPV sugerindo sua utilização em estudos epidemiológicos da doença, e mesmo na profilaxia e controle das propriedades.

CONCLUSÕES

A prevalência de infecção por BPV em animais assintomáticos é elevada e pode ser diagnosticada através da identificação viral no sangue.

Os tipos virais presentes no sangue e lesões do rebanho são semelhantes e sugerem uma migração dos vírus das lesões para o sangue.

Os tipos virais não diferem entre animais sintomáticos e assintomáticos e a co-infecção não é determinante para o desenvolvimento de lesões cutâneas.

REFERÊNCIAS

Araldi R. P., Carvalho, R. F., Melo, T. C., Diniz, N. S. P., Sant'ana, T. A., Mazzuchelli-De-Souza, J., Spadacci-Morena, D. D., Beçak, W., Stocco, R. C. 2014: Bovine Papillomavirus in the beef cattle: first description of BPV-12 and putative type BAPV8 in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v.13, n.3, p. 5644-5653, 2014.

Batista, M. V., Silva, M. A., Pontes, N. E., Reis, M. C., Corteggio, A., Castro, R. S., Freitas, A. C. 2013: Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 368-373.

Bocaneti, F., Altamura, G., Corteggio, A., Velescu, E., Roperto, F., Borzacchiello, G. 2014. Bovine Papillomavirus: New Insights into na Old Disease. *Transboundary Emerging Diseases*, <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12222>.

Borzacchiello, G., Ambrosio, V., Roperto, S., Poggiali, F., Tsirimonakis, E., Venuti, A., Campo, M.S., Roperto, F. 2003: Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the South of Italy. *J. Comp. Pathol.*, 128: 203-206.

Borzacchiello, G., Roperto, F., 2008: Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary Research* 39, 45.

Carvalho, C.C.R., Batista, M.V.A., Silva, M.A.R., Balbino, V.Q., Freitas, A.C. 2012: Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.59, p. 441–447.

Catroxo, M., Martins, A., Petrella, S., Souza, F., Nasrari, B. 2013: Ultrastructural Study of Bovine Papillomavirus During Outbreaks in Brazil. **Int. J. Morphol.**, v. 31, p. 777-784.

Finlay, M., Yuan, Z.Q., Burden, F., Trawford, A., Morgan, I.M., Campo, M.S., Nasir, L. 2009: The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. *Virus Res.*, 10: 04-15.

Freitas, A.C., Carvalho, C., Brunner, O., Birgel, Junior E. H., Dellalibera, A.M.M.P., Benesi, F. J., Gregory, L., Beçak, W., Stocco dos Santos, R.C. 2003: Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Braz. J. Microbiol.* 34, 76–78.

Freitas, A.C, Silva, M.A.R., Carvalho, C.C.R., Birgel, Jr.E.H., Santos, J.F., Beçak, W., Stocco dos Santos, R.C. 2007: Papillomavirus DNA detection in non-epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus, in Mendez-Villas, A. (Eds.), *Communicating Current research and educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 1: 697-704.

Freitas, A.C., Silva, M.A., Jesus, A.L., Mariz, F.C., Cordeiro, M.N., Albuquerque, B.M., Batista, M.V.A., 2011: Recent insights into bovine papillomavirus. *African Journal of Microbiology Research* 5, 6004–6012.

Freitas, A.C., Mariz, F.C., Silva, M.A., Jesus A.L. 2013: Human papillomavirus vertical transmission: review of current data. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1451–1456.

Gottschling, M., Göker, M., Stamatakis, A., Olaf, R.P., Bininda-Emonds, Nindl, I., Bravo, I.G. 2011: Quantifying the Phylodynamic Forces Driving papillomavirus Evolution. *Mol Biol Evol*, v. 28, n. 7, p. 2101-2113.

Hatama, S., Ishihara, R., Ueda, Y., Kanno, T., Uchida, I., 2011: Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. *Archives of Virology* 156, 1281–1285.

Hatama, S., Nobumoto, K., Kanno, T., 2008: Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *Journal of General Virology* 89, 158–163.

Lindsey, C.L., Almeida, M.E., Vicari, C.F., Carvalho, C., Yagui, A., Freitas, A.C., Beçak, W., Stocco dos Santos, R.C. 2009: Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genet. Mol. Res.*, 8: 310-318.

Monteiro, V. L. C., Coelho, M. C. O. C., Carneiro, A. S., Silva, R. F. A. A. 2008: Descrição clínica e histopatológica da papilomatose cutânea bovina (BPV). *Ciência Animal Brasileira* v.9, n.4, p. 1079-1088.

Nasir, L., Campo, M.S., 2008: Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids, *Veterinary Dermatology*, 19, 243-254.

Nicholls, P.K., Stanley, M.A., 2000: The immunology of animal papillomaviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 73, 101-127.

Ogawa, T., Tomita, Y., Okada, M., Shinozaki, K., Kubonoya, H., Kaiho, I. 2004: Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas in healthy teat skin. *Journal of General Virology*, v. 85, p. 2191-2197.

Roperto, S., Brun, R., Paolini, F., Urraro, C., Russo, V., Borzacchiello, G., Venuti, A. 2008: 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.

Roperto, S., Borzacchiello, G., Esposito, I., Riccardi, M., Urraro, C., Luca, R., Corteggio, A., Tate, R., Cermola, M., Paciello, O., Roperto, F., 2012: Productive infection of bovine papillomavirus type 2 in the placenta of pregnant cows affected with urinary bladder tumors. *PLoS ONE* 7, e33569.

Santos, E. U. D., Silva, M. A. R., Pontes, N. E., Coutinho, L. C. A., Paiva, S. S. L., Castro, R. S., Freitas, A. C. 2014: Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of Cattle. ***Transboundary and Emerging Diseases***, doi:10.1111/tbed.12237,.

Schmitt, M., Fiedler, V., Muller, M. 2010: Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPV genotyping assay. *J. Virol. Methods* 170: 67-72.

Silva, L.A.F., Santin, A.P.I., Fioravanti, M.C.S., Jaime, V.S., Eurides, D., Dias Filho, F.C. 2004: Avaliação da eficiência de diferentes tratamentos da papilomatose cutânea bovina. **Vet Not.**, v.10, n. 2, p. 35-41.

Silva, M. A. R., Carvalho, C. C. R., Coutinho, L. C. A., Reis, M. C., De Aragão Batista, M. V., De Castro, R. S., Dos Anjos, F. B. R., De Freitas, A. C. 2012: Co-infection of bovine papillomavirus and feline-associated papillomavirus in bovine cutaneous warts. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, n. 396, p. 539–547.

Silva, M.A.R., Silva, K.M.G., Jesus, A.L.S., Barros, L.O., Corteggio, A., Altamura, G., Borzacchiello, G., Freitas, A.C., 2013: The presence and gene expression of bovine papillomavirus in the peripheral blood and semen of healthy horses. *Transboundary Emerging Diseases*, <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12036>.

Stocco dos Santos, R.C., Lindsey, C.J., Ferraz, O., Pinto, J. R., Mirandola, R.S, Benesi FJ, Birgel, E.H., Bragança, C.A., Beçak, W. 1998: Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. *J. Gen. Virol.*, 79: 2127-2135.

Tomita, Y., Literak, I., Ogawa, T., Jin, Z., Shirasawa, H., 2007: Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes* 35, 243–249.

Wosiacki, S.R., Barreiro, M.A., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A. 2005: Semi-nested PCR for detection and typing of bovine Papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood from cattle with enzootic haematuria. *J. Virol. Methods* 126: 215-219.

Yagui, A., Carvalho, C., Freitas, A.C., Góes, L.G.B., Dagli, M.L.Z., Birgel Jr, E.H, Beçak, W., Stocco dos Santos, R.C. 2006: Papillomatosis in cattle: in situ detection of bovine papillomavirus DNA sequences in reproductive tissues. *Braz. J. Morphol. Sci.* 23, 525–529.

Yagui, A., Dagli, M. L. Z., Birgel Jr, E. H., Alves Reis, B. C., Ferraz, O. P., Pituco, E. M., Stocco, R. C. 2008: Simultaneous presence of bovine papillomavirus and bovine leukemia virus in different bovine tissues: in situ hybridization and cytogenetic analysis. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, n. 2, p. 487-497.

Figura 1. Perfil da idade e desenvolvimento de lesões cutâneas em bovinos naturalmente infectados por BPV - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).

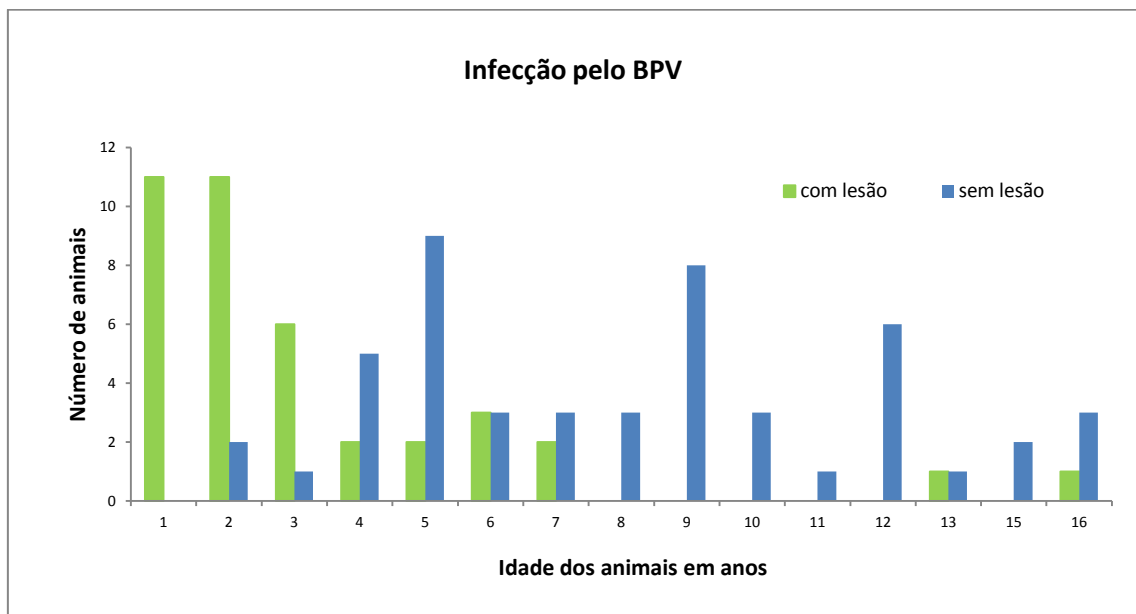


Figura 2. Distribuição dos tipos e gêneros de BPVs em lesões cutâneas coletadas de fêmeas bovinas - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015)

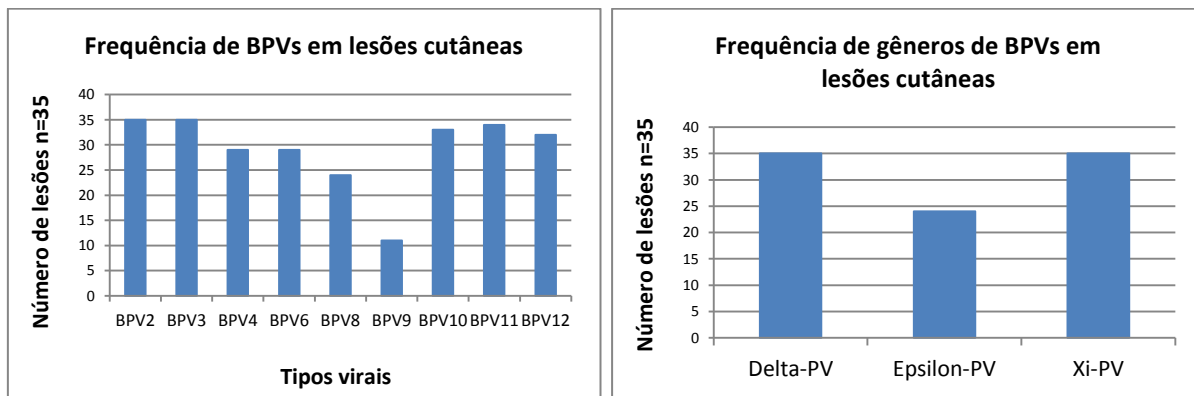


Figura 3. Distribuição dos tipos e gêneros de BPVs no sangue de fêmeas bovinas leiteiras - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015)

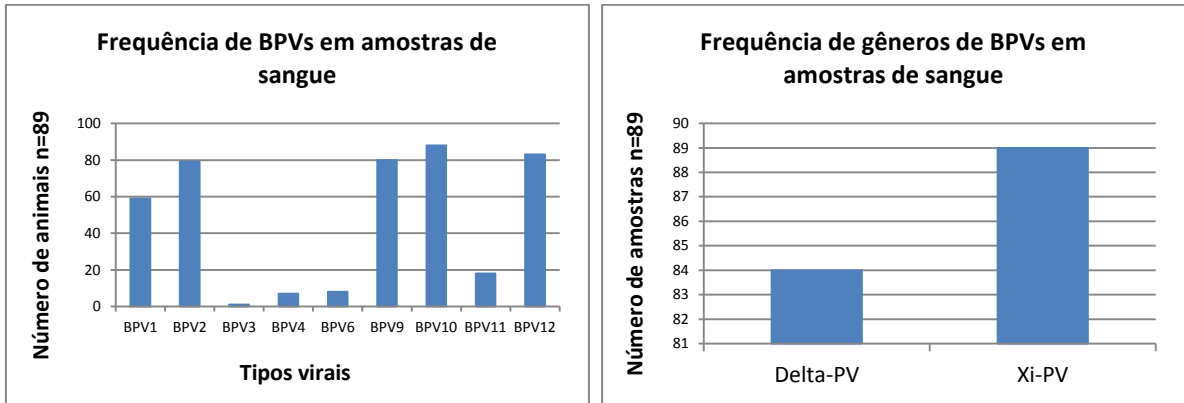


Figura 4. Associação de vírus e grupos filogenéticos de BPV em lesões cutâneas de fêmeas bovinas leiteiras - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015)

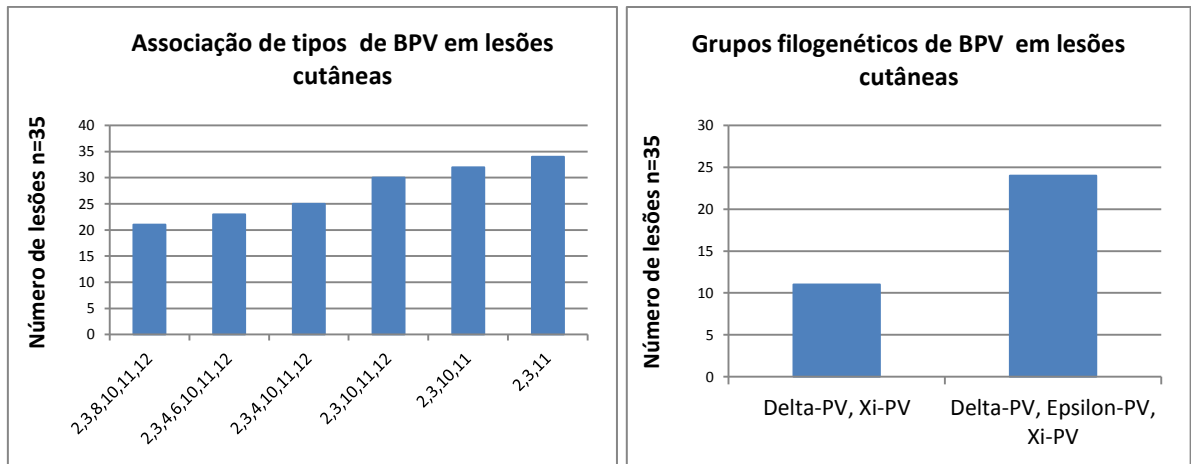


Figura 5. Associação de vírus e grupos filogenéticos de BPV em amostras de sangue de fêmeas bovinas - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015)

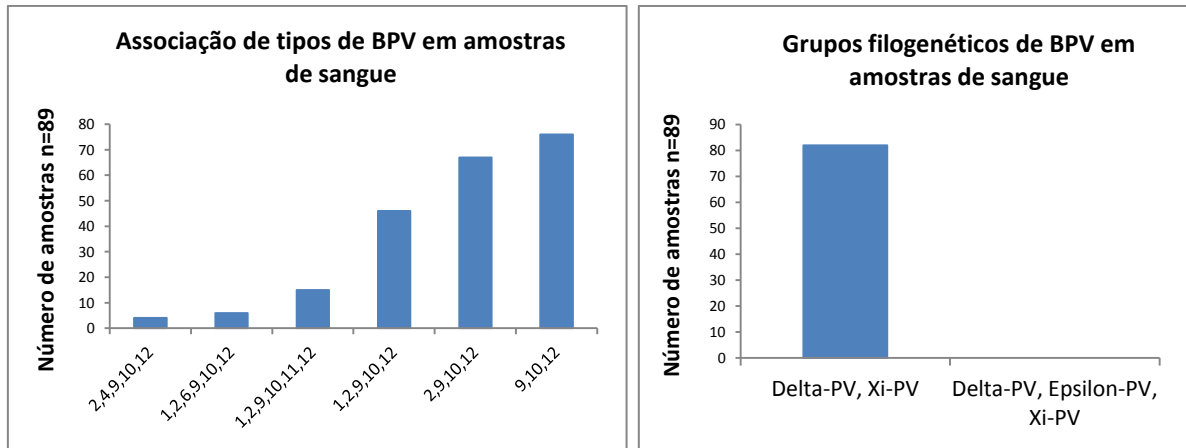


Figura 6. Comparação dos tipos de BPVs no sangue e lesões de 16 fêmeas bovinas acometidas pela papilomatose cutânea - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).

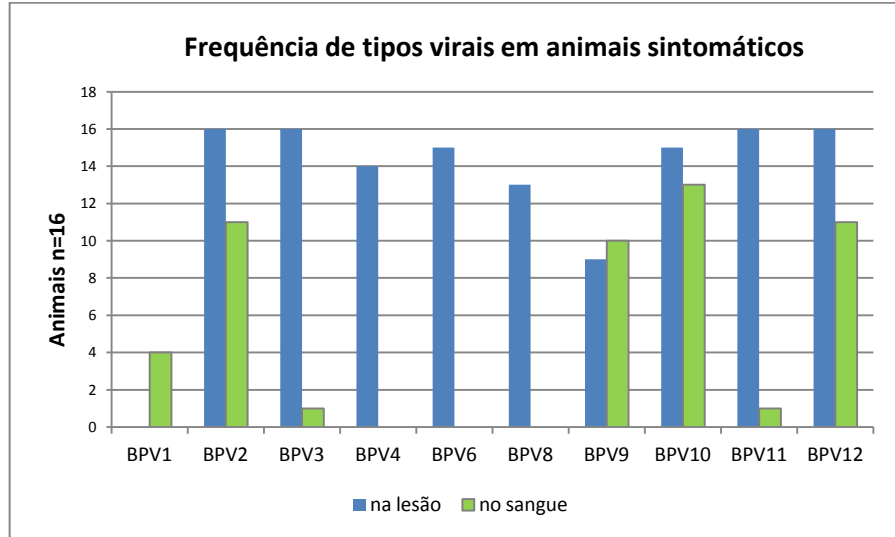


Figura 7. Tipos de BPVs no sangue de fêmeas bovinas leiteiras sintomáticas e assintomáticas - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).

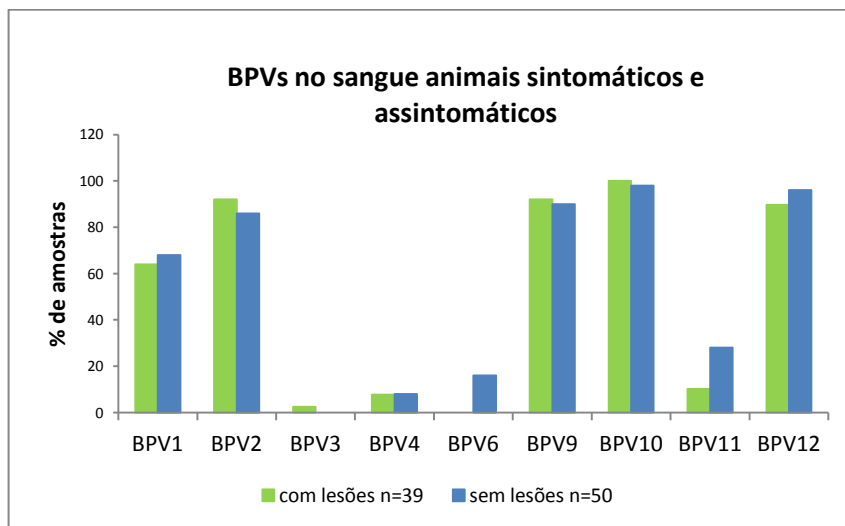
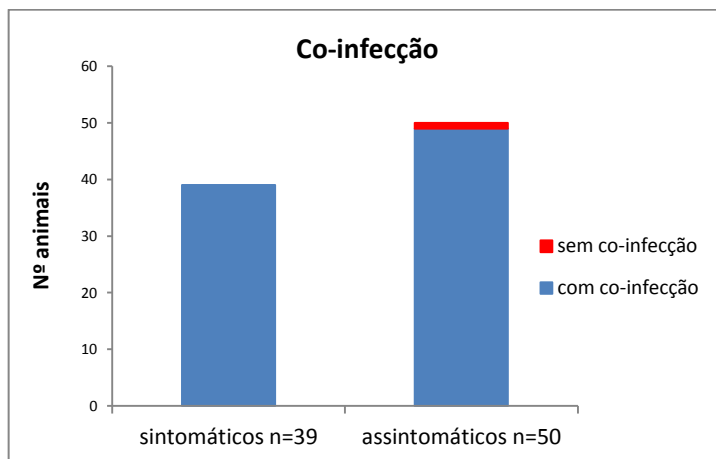


Figura 8. Frequência de co-infecção de BPVs em bovinos sintomáticos e assintomáticos - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

4.4 ARTIGO 4

Artigo configurado segundo as normas da revista **Arquivos do Instituto Biológico**.

65 INTRODUÇÃO

66 A infecção pelo Papillomavírus Bovino (BPV) pode causar papilomatose cutânea em
67 diversas áreas do corpo animal além de câncer no trato gastrointestinal e urinário de bovinos.
68 A infecção no trato gastrointestinal superior causada pelo BPV pode se estender da boca e
69 língua ao esôfago, rumem e retículo, induzindo dificuldades na alimentação e respiração que
70 comumente levam a óbito (CAMPO, 1997; DONG et al., 2013). Em animais que se
71 alimentam com a samambaia (*Pteridium aquilinum*) o desenvolvimento de câncer no trato
72 urinário e gastrointestinal é resultado da interação dos vírus com agentes químicos,
73 carcinogênicos e imunossupressores presentes na planta, e causam quadros severos,
74 debilitantes e seguidos de morte (WOSIACKI et al., 2006, ROPERTO et al., 2015).

75 A doença está amplamente difundida no rebanho bovino brasileiro e estudos sugerem
76 que 60% dos animais estejam infectados por pelo menos um tipo de papilomavírus bovino
77 (CATROXO et al., 2013). Atualmente estão identificados 13 diferentes tipos virais que
78 induzem resposta imunológica específica e vários supostos novos tipos estão em estudo
79 (FREITAS et al., 2011; CARVALHO et al., 2012; BATISTA et al., 2013, DA SILVA et al.,
80 2015).

81 O animal acometido pelo BPV pode apresentar complicações como hemorragias,
82 perda de peso, desenvolvimento retardado, feridas mecânicas, infecções secundárias, mífases,
83 problemas reprodutivos, mastite, entre outras alterações clínicas que geram perdas
84 econômicas significativas (MELO; LEITE, 2003; SILVA, 2004).

85 Numerosos tratamentos sistêmicos têm sido utilizados. Drogas comerciais como
86 levamisole, ivermectina, clorobutanol e diaceturato de diaminazina são os mais frequentes. Na
87 fitoterapia, *Thuya occidentalis* tem sido empregada no tratamento da papilomatose cutânea
88 apresentando resultados positivos (MONTEIRO, 2011). No entanto, nenhum dos tratamentos

89 é específico e não apresentam resultados constantes. (CORREA; CORREA, 1992;
90 MONTEIRO, 2008).

91 A auto-hemoterapia é o tratamento mais empregado nas propriedades, utiliza sangue
92 venoso de animal acometido reaplicado imediatamente após a retirada, via intramuscular ou
93 subcutânea. As vacinas autógenas, também frequentemente utilizadas, são preparadas com
94 tecidos macerados dos papilomas do rebanho que será imunizado e aplicadas também por via
95 intramuscular (CORREA; CORREA, 1992; HAMA et al., 1998; MURO et al., 2008).

96 Estes tratamentos baseiam-se na tentativa de desencadear um estímulo imunológico
97 de defesa do organismo animal, levando a eliminação das lesões, no entanto, têm caráter
98 curativo e individual. Não são práticos para o manejo das propriedades, pouco seguros e
99 devem ser evitados no uso como preventivo assim como a aplicação em todo o rebanho
100 devido à possibilidade de causar novas infecções e infecções cruzadas (CORREA; CORREA,
101 1992; SOUZA, 2013).

102 O desenvolvimento de vacinas profiláticas e/ou terapêuticas para BPVs continua
103 sendo um desafio para os cientistas (RUIZ et al., 2015). As lesões podem ser causadas por
104 pelo menos 13 diferentes tipos virais e a imunidade desenvolvida pelo organismo animal
105 contra o vírus é específica para cada tipo viral (LUNARDI et al., 2013).

106 Neste contexto, a utilização da isoterapia no tratamento da infecção por BPV
107 representa importante possibilidade no controle da doença. Ao longo dos anos, a isoterapia
108 tem se mostrado um método eficaz no tratamento de infecções crônicas e recorrentes e sua
109 indicação está relacionada a patologias em que inexistem tratamentos satisfatórios, vacinas e
110 na impossibilidade de uso de produtos alopáticos como em rebanhos submetidos ao manejo
111 orgânico (SILVA, 2005).

112 Consiste no método de tratamento baseado na lei “*igual cura igual*” que utiliza o
113 agente causal da doença para produzir, seguindo a metodologia da farmacopeia homeopática,
114 medicamentos diluídos e dinamizados que irão induzir a cura e prevenção da doença
115 (MITIDIÉRO, 2002; LUZ et al., 2013).

116 Esta terapia tem sido utilizada em inúmeras condições clínicas humanas e animais
117 (SILVA et al., 2005; QUEIROZ et al., 2006; LESSA et al., 2008; AGOSTINHO, et al., 2010)
118 e segue a premissa de que os microrganismos ou antígenos que causam uma doença
119 específica, quando diluídos e dinamizados tornam-se potentes medicamentos específicos para
120 aquela patologia sem expor o paciente ao risco do contato com o agente (LYRIO, 2002;
121 FONTES, 2005; MONTEIRO, 2009).

122 Os medicamentos são denominados bioterápicos e têm como matéria prima o agente
123 causal da doença elaborado a partir de culturas de bactérias, fungos, vírus, ácaros, vermes,
124 secreções ou excreções patológicas de origem vegetal ou animal, do próprio paciente (auto-
125 isoterápicos) ou exógenas (heteroisoterápicos) (COELHO, 2010).

126 Os bioterápicos são utilizados a partir da diluição 12CH ou D24, sendo a diluição
127 D30 mais empregada. A prática homeopática afirma que o número de Avogrado ($6,02 \times 10^{23}$
128 átomos / mol de substância) é ultrapassado acima da diluição D24 não sendo mais possível
129 detectar moléculas da substância que deram origem ao medicamento, garantindo sua
130 segurança (COSTA, 1988; BASTIDE et al., 1995; MONTERIO, 2007; BRASIL, 2011)

131 Os tratamentos disponíveis para BPV são dispendiosos, insatisfatórios, permitem
132 recidivas, apresentam resultados não reproduzíveis e levam o produtor a descartar
133 precocemente animais de alto valor zootécnico (SANTIN et al., 2004). Desta forma, a busca
134 por tratamentos de menor custo, mais seguros e eficazes é uma necessidade da pecuária,
135 justificando o objetivo deste estudo de produzir bioterápicos a partir do sangue e lesões de

136 bovinos naturalmente infectados, avaliar por biologia molecular os medicamentos produzidos
137 e confrontar sua composição com o estudo epidemiológico no rebanho utilizado.

138 MATERIAL E MÉTODOS

139 O projeto para realização deste estudo foi encaminhado à Comissão de Ética no Uso
140 de Animais – CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE para
141 apreciação e aprovado através do protocolo N°23082.013040/2015-49.

142 O trabalho foi desenvolvido no Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA) - Estação
143 Experimental de Itambé - EEI, localizada na Zona da Mata pernambucana e no Laboratório de
144 Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE) do Departamento de Genética da
145 Universidade Federal de Pernambuco.

146 Foram utilizadas fêmeas bovinas da raça Girolando 5/8, com idade variando entre um
147 e 16 anos, provenientes do IPA - EEI, identificadas através de brincos numerados, criadas de
148 forma semi-intensiva, alimentadas em pastagens de braquiária, recebendo água e sal mineral
149 específico para bovinos *ad libitum*, everminadas e vacinadas contra raiva, febre aftosa e
150 brucelose.

151 **Produção dos bioterápicos**

152 A **coleta de material** para produção do bioterápico de sangue utilizou 1mL de
153 sangue venoso, por venopunção da jugular, sem anticoagulante de 16 animais, dispensados
154 em tubo coletor contendo 10mL de água destilada estéril para produção de um “pool” de
155 sangue.

156 Para o bioterápico das lesões foram coletados dos 16 animais 35 fragmentos de
157 papilomas típicos, atípicos e filamentosos, em regiões do corpo animal como cabeça, dorso,
158 membros, úbere, cauda, pescoço, barbel e ventre, coletados por desprendimento e, quando
159 necessário, através de biópsia em regiões previamente anestesiadas com lidocaína a 2% e
160 incisão elíptica com lâmina de bisturi. Foram coletadas para cada animal lesões que

161 apresentavam tipo/características diferentes. As amostras foram acondicionadas em um tubo
162 coletor contendo 10mL de água destilada estéril para produção de um “pool” de papilomas.

163 Os tubos coletores contendo os “pools” de sangue e papilomas foram mantidos
164 refrigerados e encaminhados à farmácia homeopática.

165 A **técnica homeopática** utilizada para produção dos medicamentos foi realizada por
166 farmacêutico especializado, em farmácia de manipulação homeopática e seguindo a
167 Farmacopeia Homeopática Brasileira e o Manual de Normas Técnicas para a Farmácia
168 Homeopática Brasileira.

169 O “pool” de papilomas foi macerado com 10mL de água destilada estéril, a seguir
170 adicionado 1mL desta mistura ao frasco nº1, contendo 9mL de álcool de cereal a 70%. Este,
171 submetido a 100 sucussões vigorosas e regulares, em sentido vertical e em aparelho
172 dinamizador, obtendo-se assim a primeira dinamização decimal (D1). Na sequência, 1mL da
173 primeira dinamização foi transferido para o frasco nº2 contendo 9mL de álcool de cereal a
174 70%, submetido a 100 sucussões, correspondendo à segunda dinamização decimal (D2). Esta
175 sequência foi repetida até a obtenção do frasco nº30 correspondente a trigésima dinamização
176 decimal de *Papilomavírus bovino* D30 ou 30DH do “pool” de papilomas.

177 O mesmo processo foi realizado em separado para sangue obtendo-se ao final a
178 trigésima dinamização decimal de *Papilomavírus bovino* D30 ou 30DH do pool de sangue.

179 A **análise molecular dos bioterápicos** do sangue e das lesões foi realizada para as
180 diluições D1, D5, D10, D15, D20, D25 e D30 de duas partidas diferentes para cada diluição e
181 em duplicata.

182 Para a **precipitação de DNA** foi utilizada uma alíquota de 750µL da amostra do
183 bioterápico homogeneizado. A amostra foi centrifugada a 8000 rotações por minuto (rpm) por
184 cinco minutos e descartado o sobrenadante. Ao pellet foi adicionado 1mL de PBS1x,

185 homogeneizado, incubado por uma hora em temperatura ambiente, centrifugado a 8000 rpm
186 por cinco minutos, descartado o sobrenadante e secagem do pellet em speedvac por 20
187 minutos. Pesagem da amostra e extração de DNA.

188 A **extração de DNA** foi realizada através do kit Wizard Genomic Purification A1125
189 (Promega, Fitchburg, Estados Unidos) seguindo as instruções preconizadas pelo fabricante
190 para extração de DNA de tecido.

191 Para a **quantificação de DNA** das amostras utilizou-se Nanovue (GE, Fairfield,
192 Estados Unidos), água para injeção e álcool a 70% como branco para leitura e três repetições
193 por amostra.

194 A **identificação de BPV** nas diluições dos bioterápicos foi realizada através da
195 técnica da PCR para identificação viral utilizando-se Master Mix Promega Kit (Promega,
196 Fitchburg, Estados Unidos), primers BPV tipo-específico, conforme descrito por SILVA et
197 al.(2003), para BPV1, 2, 3, 8 e 10 e os produtos da PCR foram visualizados na eletroforese
198 em gel de Agarose 2% TAE corados com Brometo de Etídio e fotografados.

199 **Estudo epidemiológico molecular do rebanho**

200 Para o estudo epidemiológico do rebanho quanto à infecção por BPV no sangue,
201 foram coletadas amostras de sangue de 89 animais da propriedade por venopunção da jugular
202 em tubos tipo “vacutainer” contendo EDTA para extração de DNA e genotipagem do vírus.

203 Para o estudo epidemiológico do BPV nas lesões do rebanho foram utilizados
204 fragmentos das 35 lesões coletadas para produção do bioterápico de lesões.

205 Todas as amostras foram acondicionadas em recipiente estéril, mantidas refrigeradas
206 e encaminhadas ao LEMTE.

207 O DNA genômico sanguíneo foi extraído de uma alíquota de 200µL da amostra
208 através do kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Alemanha). O DNA genômico dos

209 papilomas foi extraído de fragmentos de 20mg de tecido através do kit Wizard Genomic
210 Purification A1125 (Promega, Fitchburg, Estados Unidos). Ambos seguindo-se as instruções
211 preconizadas pelo fabricante. Para quantificação de DNA das amostras utilizou-se Nanovue
212 (GE, Fairfield, Estados Unidos), e a qualidade do DNA foi aferida através da Reação em
213 Cadeia de Polimerase (PCR) do gene da β -globina como descrito por FREITAS et al. (2003).

214 Para genotipagem do vírus no sangue e lesões, o DNA viral foi amplificado através
215 de PCR utilizando Master Mix Promega Kit (Promega, Fitchburg, Estados Unidos), primers
216 BPV tipo-específico (BPV1 - BPV12, exceção de BPV-7), conforme descrito por SILVA et
217 al.(2003). Todos os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel
218 de Agarose 2% TAE corados com Brometo de Etídio e fotografados.

219 RESULTADOS

220 Foram obtidos dois bioterápicos produzidos a partir do sangue e fragmentos de
221 lesões na diluição D30 sendo denominados “BiotSan” (bioterápico do “pool” de sangue) e
222 “BiotLes” (bioterápico do “pool” de lesões cutâneas). Para ambos os medicamentos obteve-se
223 da farmácia homeopática as diluições D1 a D30. Nas diluições D1 a D5 do pool de papilomas
224 foi possível observar pequenos fragmentos de tecido e no pool de sangue observou-se
225 coloração rósea na diluição D1.

226 A precipitação do DNA das amostras dos medicamentos nas várias diluições mostrou
227 ao final do processo um pellet que variou em peso. Para o BiotSan o pellet variou de 0,21mg a
228 8,47mg. Para o BiotLes o peso do pellet variou de 0,28mg a 1,03mg.

229 A quantificação de DNA variou entre 5.0ng/ μ L a 8.4ng/ μ L nas diluições dos
230 bioterápico BiotSan e BiotLes. As quantidades de DNA das amostras menos diluídas (D1) em
231 relação às mais diluídas (D25, D30) foram semelhantes, para ambos os bioterápicos.

232 As análises para identificação de vírus nos bioterápicos demonstraram a presença de
233 BPVs dos tipos BPV2, 3, 8 e 10, pertencentes aos gêneros Delta, Epsilon e Xipapillomavirus.
234 BPV1 não foi identificado nos bioterápicos.

235 A identificação dos tipos virais nas diferentes diluições do BiotLes e BiotSan estão
236 demonstradas na Fig.1. No bioterápico BiotLes, BVP2 foi identificado nas diluições D1 a
237 D30, BPV3 nas diluições D5, D20 e D30, BPV8 nas diluições D5 a D30, BPV10 nas
238 diluições D1 a D30. Para o bioterápico BiotSan, BPV2 foi encontrado nas diluições D1 a
239 D30, BPV3, BPV8 e BPV10 não foram identificados em nenhuma das diluições.

240 A identificação de BPVs na diluição D30 foi um resultado inesperado de acordo com
241 a prática homeopática sendo repetida toda a metodologia de análise molecular dos
242 bioterápicos para esta diluição testando-se nova partida do medicamento. As novas análises
243 confirmaram os achados anteriores mostrando a diluição D30 positiva para BPV2 no
244 bioterápico BiotSan e BiotLes.

245 O estudo epidemiológico molecular do rebanho mostrou que 89/89 animais
246 acompanhados estavam infectados pelo Papillomavírus bovino. Foram identificados BPVs em
247 todas as amostras coletadas de sangue (89/89) e lesões cutâneas (35/35), e os tipos virais mais
248 frequentes estão demonstrados na Fig.2.

249 DISCUSSÃO

250 A elevada frequência de infecção por Papillomavirus Bovino na propriedade mostra
251 a importância destes vírus na sanidade do rebanho brasileiro. Os animais avaliados
252 representaram 66,6% do rebanho da propriedade estudada e 100% estavam infectados,
253 sugerindo que o nível de infecção nos bovinos supera a estimativa de CATROXO *et al.*
254 (2013). Da mesma forma, estes autores citam que a infecção seria causada por pelo menos um

255 tipo viral, no entanto os animais avaliados apresentaram infecções por no mínimo 6 diferentes
256 tipos de BPV no sangue e nas lesões.

257 A identificação no rebanho de 10 entre os 11 tipos virais testados mostra alta
258 circulação dos vírus, considerando-se, sobretudo, que no rebanho mundial são reconhecidos
259 13 BPVs e destes, 10 foram detectados em uma única propriedade no Brasil. Estes resultados
260 corroboram os achados de CARVALHO *et al.* (2012), BATISTA *et al.* (2013) e
261 GRINDATTO *et al.* (2015), e demonstram a complexidade da epidemiologia do BPV,
262 caracterizada pela circulação de múltiplos tipos virais mesmo em rebanho único, e reafirmam
263 a necessidade da produção de medicamentos e vacinas, com atuação sobre vários tipos virais
264 já que a resposta imune induzida pelo BPV é sabidamente tipo-específica e que os animais
265 podem sofrer infecções sucessivas através de tipos virais diferentes, apesar do
266 desenvolvimento imunológico para infecções prévias (KNOWLES *et al.*, 1996).

267 A produção dos bioterápicos BiotSan e BiotLes utilizou como técnica homeopática o
268 álcool de cereais 70% desde a primeira diluição (D1), diferindo de autores, como COSTA
269 (1998; 2002) e SIQUEIRA (2009) que utilizam água destilada na preparação de bioterápicos
270 para manter a viabilidade do microrganismo, sugerindo maior potencial imunogênico do
271 medicamento (MARINHO, 2008). A opção do álcool como solvente desde a primeira
272 diluição, neste estudo, teve por objetivo elevar a segurança dos bioterápicos ao promover a
273 inativação do vírus, atender a orientação da Farmacopeia Brasileira, que determina o estoque
274 e comercialização dos bioterápicos em álcool 70% (BRASIL, 2011), garantindo maior
275 durabilidade ao produto, permitindo o uso prolongado e para maior número de animais.

276 O peso do pellet e a quantificação de DNA após a extração não foram relevantes nas
277 avaliações dos bioterápicos. Esperava-se encontrar valores proporcionalmente decrescentes a
278 partir do aumento das diluições, no entanto os resultados apresentaram-se aleatórios,

279 mostrando que o equipamento não foi capaz de mensurar com precisão, provavelmente por se
280 tratar de quantidades pequenas de DNA.

281 A identificação de vírus na primeira diluição (D1) dos bioterápicos foi um resultado
282 esperado para as diluições iniciais e serviu como parâmetro de avaliação da produção e
283 avaliação dos medicamentos.

284 A presença do BPV2, BPV3, BPV8 e BPV10, pertencentes aos três diferentes
285 gêneros de Papillomavírus que acometem os bovinos, nos bioterápicos, demonstra que os
286 agentes etiológicos da doença, responsáveis pela indução da resposta imune do animal, estão
287 presentes nos medicamentos e esta possibilidade de identificar a composição dos bioterápicos
288 é um diferencial do BiotSan e BiotLes. A composição por múltiplos vírus é outra
289 característica importante. Como os BPVs induzem resposta imunológica específica para cada
290 tipo viral e a isoterapia utiliza “igual para curar o igual”, quanto maior o número de tipos de
291 BPVs nos bioterápicos, maior a probabilidade destes medicamentos estimularem reação
292 imunológica do animal atuando para o tratamento e prevenção da doença.

293 Neste aspecto, o BiotSan ao ser identificado apenas com BPV2 demonstrou
294 composição inferior, quando comparado ao BiotLes, no entanto a não identificação pela
295 análise molecular não exclui a possibilidade da existência de outros tipos virais neste
296 bioterápico, principalmente diante da múltipla circulação de vírus no rebanho, sugerindo a
297 possibilidade que outros tipos de BPVs, se testados, poderiam estar presentes.

298 A comparação entre os dois bioterápicos, no entanto, é uma análise necessária. A
299 produção do BiotLes requer manejo mais elaborado e dispendioso dos animais para coleta das
300 lesões, assim como a maceração e homogeneização demandam mais custos e trabalho na
301 farmácia homeopática quando comparados a coleta e manipulação do sangue. Portanto,

302 produzir o BiotSan com as características semelhantes ao BiotLes é imprescindível por
303 representar menor custo, mais praticidade e deve ser buscado em estudos posteriores.

304 A diferença na composição pode ser justificada pela natureza característica dos vírus
305 que têm as células basais dos epitélios mucoso e cutâneo como sítios primários de
306 localização, embora possam ser detectados em outros tecidos e células, entre estes, o sangue
307 (FREITAS et al., 2003; YAGUIU et al., 2006, LINDSEY et al., 2009, SILVA et al., 2011).
308 Portanto, por não ser a localização primária do BPV, os animais poderiam estar infectados
309 pelos vírus, no entanto, os mesmos não se encontravam na corrente sanguínea ou estavam, em
310 menor quantidade de cópias, sugerindo que para uma melhor composição do BiotSan, o
311 número de animais a serem colhidas amostras de sangue para produção do bioterápico seja o
312 maior possível dentro do rebanho.

313 Em diluições superiores a D1, a identificação de BPV3, BPV8 e BPV10 foi
314 inconstante. Este achado provavelmente está associado tanto à frequência em que os vírus
315 ocorreram nas amostras utilizadas para produção do bioterápico, como em relação à expressão
316 desses vírus (quantidade de moléculas) presentes. A ausência destes vírus em algumas
317 diluições não é relevante sob o ponto de vista de composição dos bioterápicos, desde que os
318 tipos virais estiveram presentes em pelo menos uma diluição do medicamento.

319 A ausência de BPV1 em todas as análises do BiotLes corrobora o estudo da
320 epidemiologia viral nas lesões do rebanho, nas quais não foi encontrado BPV1, e mostra a
321 eficiência da análise molecular dos bioterápicos.

322 Tendo em vista a alta incidência de BPV1 nos rebanhos brasileiros e mundiais, a
323 ausência deste tipo viral nos bioterápicos BiotSan e BiotLes é um achado indesejado quando
324 se considera a possibilidade de uso destes medicamentos para tratamento e prevenção em
325 outras propriedades.

326 Em relação ao BiotSan, embora BPV1 estivesse presente em 4/16 (25%) amostras
327 sanguíneas utilizadas para produção do bioterápico, a não identificação no medicamento pode
328 estar associada à pequena quantidade de amostras, à expressão do vírus, quantidade de
329 moléculas presentes, como também pelo fato do sangue não ser a localização primária do
330 vírus justificando a presença, porém em menor quantidade de cópias. A ausência de BPV1
331 nos bioterápicos reflete a epidemiologia molecular do BPV no rebanho estudado, reforçando a
332 importância deste estudo na produção dos medicamentos.

333 O estudo da epidemiologia molecular do rebanho foi fundamental para a produção
334 dos bioterápicos. A partir do diagnóstico dos tipos virais presentes no rebanho, foi possível
335 confrontar e entender os achados dos tipos virais encontrados nos medicamentos. Neste caso,
336 a produção dos bioterápicos seguida pela avaliação molecular através da PCR e análise da
337 epidemiologia molecular do rebanho permitiu a produção de medicamentos mais elaborados e
338 representam um avanço quando comparado à auto-hemoterapia e a autovacina.

339 Embora os tratamentos partam do mesmo princípio: a utilização de tecidos e sangue
340 infectados como estímulo a atuação do sistema imunológico dos animais para regressão das
341 lesões, para os bioterápicos é possível conhecer a composição do produto em relação aos tipos
342 virais presentes, a produção pode ser única e mantida na farmácia homeopática, podem
343 atender melhor a realidade do rebanho, são superiores em segurança por serem diluídos e
344 dinamizados garantindo tratamento e prevenção da doença em todos os animais, em várias
345 propriedades e apresentam praticidade de administração na água ou alimentação do rebanho.

346 A prática homeopática afirma que a diluição D30 é altamente eficaz sendo utilizada
347 com segurança para o tratamento e profilaxia de infecções intra e extracelulares (COSTA,
348 1988; MONTERIO, 2009), justificando a escolha desta diluição para produção do BiotSan e
349 BiotLes. BASTIDE et al.(1995) e MONTEIRO (2009) afirmam que o número de Avogrado

350 (6,02 x 10²³ átomos / mol de substância) é ultrapassado acima da diluição D24 não sendo mais
351 possível detectar moléculas da substância que deram origem ao medicamento e que a diluição
352 D30 não apresenta qualquer risco de infecção aos pacientes. No entanto, através da biologia
353 molecular com a técnica da PCR, foi demonstrada nos bioterápicos produzidos a presença de
354 partículas virais na diluição D30, impedindo a recomendação de utilização destes bioterápicos
355 nesta diluição em animais.

356 Não é possível afirmar a viabilidade destas partículas virais em causar infecções.
357 SIQUEIRA (2009) produziu bioterápico em água destilada a partir do vírus da influenza na
358 diluição D30 e realizou vários testes para avaliar a capacidade infectiva do bioterápico,
359 incluindo a inoculação em ovos embrionados, demonstrando a inexistência de partículas virais
360 capazes de gerar infecção. No entanto, são resultados únicos e demonstram a necessidade de
361 novos estudos com outros agentes etiológicos para esclarecimento e confirmação.

362 Não foram encontrados na literatura estudos utilizando a biologia molecular, através
363 da técnica da PCR, para detecção de partículas de DNA em bioterápicos. SIQUEIRA (2009)
364 utilizou espectroscopia UV-vis para pesquisar material genético de origem viral no
365 bioterápico Influenzum D30, a qual não foi capaz de detectar nenhuma partícula. Acredita-se,
366 entretanto, que a alta sensibilidade e especificidade da técnica da PCR foram determinantes
367 para os achados da identificação viral na diluição D30 dos bioterápicos BiotSan e BiotLes.
368 SILVA (1998) e MOLINA; TOBO (2004) relatam a importância da biologia molecular
369 através da PCR para o diagnóstico de doenças infecciosas.

370 Embora a diluição D30 não possa ser recomendada para o uso em animais, os
371 resultados das análises demonstram que o BiotSan e o BiotLes são medicamentos
372 promissores, de boa composição, controle e identificação de produção e podem contribuir
373 com o tratamento e prevenção da infecção por Papillomavírus Bovino. Para tanto, as diluições

374 dos bioterápicos devem ser continuadas até a identificação da diluição na qual inexistam
375 partículas virais ou até que a técnica de avaliação molecular não seja sensível para
376 identificação, com posterior avaliação em animais.

377 CONCLUSÕES

378 A partir dos resultados encontrados pode-se concluir que as técnicas empregadas
379 para produção e caracterização dos bioterápicos BiotLes e BiotSan de Papillomavírus Bovino
380 foram eficazes;

381 Novos estudos devem ser realizados para determinar a diluição homeopática para
382 qual inexista material viral, recomendando os bioterápicos para o uso em animais.

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403 **Fig. 1.** Tipos de BPVs encontrados nos bioterápicos BiotLes e BiotSan nas diluições D1, D5,
404 D10. D15. D20. D25 e D30 - Itambé. Zona da Mata de Pernambuco (2015).

Diluições	Bioterápicos	
	BiotLes	BiotSan
D1	BPV- 2, -10	BPV2
D5	BPV-2, -3, -8, -10	BPV2
D10	BPV-2, -8, -10	BPV2
D15	BPV-2, -8, -10	BPV2
D20	BPV-2, -3, -8, -10	BPV2
D25	BPV-2, -8, -10	BPV2
D30	BPV-2, -3, -8, -10	BPV2

405

406

407

408

409

410

411

412

413

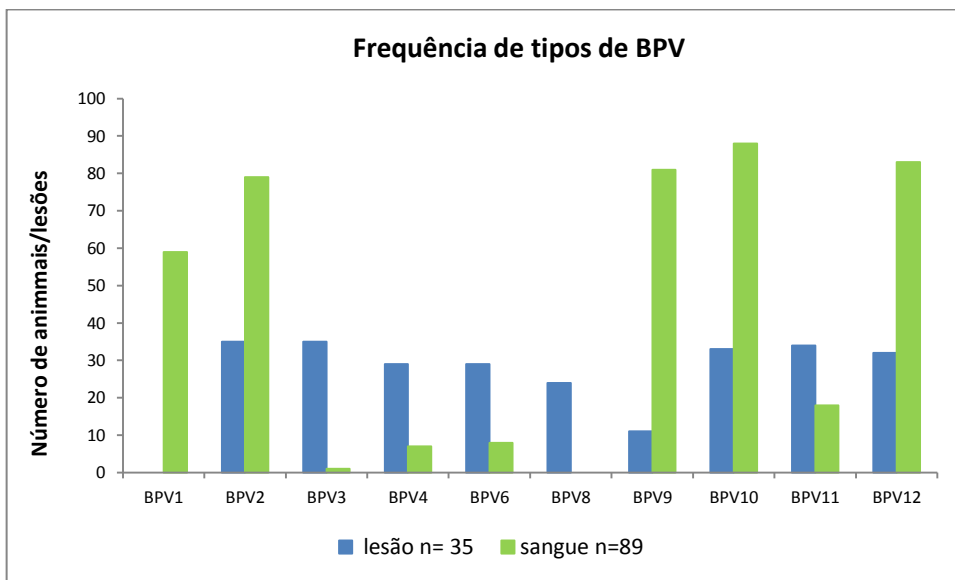
414

415

416

417

418 **Fig. 2.** Frequência dos tipos de BPVs encontrados em amostras de sangue e lesões cutâneas de fêmeas bovinas leiteiras - Itambé, Zona da Mata de Pernambuco (2015).



419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

432 AGOSTINHO, J. M. A.; DE FREITAS, F. C. Avaliação do efeito do medicamento
433 isoterápico comercial na prevenção de mastite subclínica. *Nucleus Animalium*, v.2,
434 n.2, p.1-8, 2010.

435
436 BASTIDE, M., LAGACHE, A., LEMAIRE-MISONNE, C. Le paradigme des
437 signifiants: schème d'information applicable à l'Immunologie et à l'Homéopathie.
438 *Rev Int Systémique*, v.9, p.237–249, 1995.

439
440 BATISTA, M. V., SILVA, M. A., PONTES, N. E., REIS, M. C., CORTEGGIO, A.,
441 CASTRO, R. S., ... FREITAS, A. C. Molecular epidemiology of bovine
442 papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle.
443 *The Veterinary Journal*, v. 197, n. 2, p. 368-373, 2013.

444
445 CAMPO, M.S. Papillomavirus and cancer. *The Veterinary Journal*, v.154, p.175–
446 188, 1997.

447
448 CARVALHO, C. C. R., BATISTA, M. V. A., SILVA, M. A. R., BALBINO, V. Q.
449 AND FREITAS, A. C. Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a
450 putative new bpv11 subtype in cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, v.59,
451 p.441–447, 2012.

452 CATROXO, M., MARTINS, A., PETRELLA, S., SOUZA, F., NASRARI, B.
453 Ultrastructural study of bovine papillomavirus during outbreaks in Brazil.
454 *International Journal Morphology*, v.31, p.777-784, 2013.

455
456 COELHO, C. P. Avaliação de tratamento homeopático em suínos infectados por
457 *Escherichia coli*. 2010. 114p. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e
458 Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia do Estado
459 de São Paulo, São Paulo, 2010.

460 Disponível em: <[http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-27092012-](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-27092012-102620/)
461 [102620/](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-27092012-102620/)>. Acesso em: 20 mar. 2015.

462
463 CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. (Ed.) *Enfermidades infecciosas dos mamíferos*
464 *domésticos*. 3rd.ed. São Paulo: Ed. Médica e Científica Ltda, 1992. 943p.

465 COSTA, R.A. *Homeopathies atualizada*. 3rd ed. Petropolis: Ed Vozes, 1988, 76p.

466
467 COSTA, R.A. *Nosódios Vivos*. 1st ed. Rio de Janeiro: Farmácia Homeopática
468 Átomo Ltda., 2002, 95p.

469
470 DA SILVA, F. R., DAUDT, C., STRECK, A. F., WEBER, M. N., LEITE FILHO, R.
471 V., DRIEMEIER, D., CANAL, C. W. Genetic characterization of amazonian bovine
472 papillomavirus reveals the existence of four new putative types. *Virus Genes*, v.51,
473 n.1, p.77-84, 2015.

474

- 475 DE SOUZA, J. M.. Clonagem e expressão do gene E6 do Papilomavírus Bovino do
476 tipo. 2013. 131f. Dissertação (Mestrado - Interunidades em Biotecnologia) – Instituto
477 de Ciências Biomédicas – Butantan Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
478 Disponível em: <[http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-05112013-
479 094703/en.php](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-05112013-094703/en.php)> . Acesso em: 20 mar. 2015.
480
- 481 DONG, J., ZHU, W., GOTO, Y., HAGA, T. Initial detection of a circular genome
482 deletion in a naturally bovine papillomavirus-infected sample. *Journal of Veterinary
483 Medicine Science*, v.75, p.179–182, 2013.
484
- 485 FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. 3rd ed. Brasil: Ministério da
486 Saúde, 2011.
487
- 488 FONTES, O.L. Farmácia Homeopática: Teoria e Prática. 2nd ed. São Paulo: Malone,
489 2005, 158p.
490
- 491 FREITAS A.C., CARVALHO C., BRUNNER O., BIRGEL-JR E.H.,
492 DELLALIBERA A.M.M.P., BENESI HAMA, C., MATSUMOTO, T.,
493 FRANCESCHINI, P.H. Papilomatose bovina: avaliação clínica de diferentes
494 produtos utilizados no controle e tratamento. *Ciência Veterinária*, v.2, n.2, p.14,
495 1988.
496
- 497 FREITAS, ANTONIO CARLOS DE et al . Viral DNA sequences in peripheral blood
498 and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Brazilian Journal
499 of Microbiology*, São Paulo, v.34, p.76-78, 2003. Suplemento 1.

500

501 FREITAS, A.C., SILVA, M.A.R., JESUS, A.L.S., MARIZ, F.C., CORDEIRO,
502 M.N., ALBUQUERQUE, B.M.F., BATISTA, M.V.A.. Recent insights into bovine
503 papillomavirus. *African Journal of Microbiology Research*. v.5, n.33, p.6004-6012,
504 2011.

505

506 GREGORY, F. J. L., BEÇAK, W., SANTOS, R.C.S. Viral DNA sequences in
507 peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1.
508 *Brazilian Journal of Microbiology*. V.34, n.1, p.76-78, 2003.

509

510 GRINDATTO, A., FERRARO, G., VARELLO, K., CRESCIO, M. I., MICELI, I.,
511 BOZZETTA, E., NAPPI, R. Molecular and histological characterization of bovine
512 papillomavirus in North West Italy. *Veterinary Microbiology*, 2015.

513

514 HAMA, C., MATSUMOT, T., FRANCESCHINI, P. H. Papilomatose Bovina:
515 avaliação clínica de diferentes produtos usados no controle e tratamento. *Ciência*
516 *Veterinária*, v.2, n.2, p.14-15, 1998.

517

518 KNOWLES, GRAHAM; O'NEIL, BRIAN W.; CAMPO, M. SAVERIA.
519 Phenotypical characterization of lymphocytes infiltrating regressing papillomas.
520 *Journal of Virology*, v.70, n.12, p.8451-8458, 1996.

521

522 LINDSEY, C.L., ALMEIDA, M.E., VICARI, C.F., CARVALHO, C. Bovine
523 papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine

524 papillomavirus-infected animals. *Genetic. Molocular. Research*,v.8, p.310-318,
525 2009.

526

527 LESSA, D.A.B., JÚNIOR, F.F.L., CERQUEIRA, A.D.M.F., DOS SANTOS, O.J.,
528 DE PAULA PEREIRA, J.N., DIECKMANN, A.M. Tratamento isoterápico de
529 dermatofilose em equino: relato de caso. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*,
530 v.15, n.2, 2008.

531

532 LUNARDI, M., ALFIERI, A.A., OTONEL, R.A., ALCANTARA, B.K.,
533 RODRIGUES, W.B., MIRANDA, A.B., ALFIERI, A.F. Genetic characterization of
534 a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Veterinary*
535 *Microbiology*, v.162, p.207-213, 2013.

536

537 LUZ, K.C., ZANIN, S.M.W., DIAS, J.F.G. A utilização de bioterápicos e
538 isoterápicos em Curitiba. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v.14, n.1, 2013.

539

540 LYRIO, C. (Ed.) Nosódios bioterápicos: repertório. Rio de Janeiro, 2002. 71p.

541

542 MARINHO, M.L. 2008. 113f. Ação terapêutica do bioterápico de *Mycoplasma*
543 *agalactiae* em caprinos com agalaxia contagiosa dos ovinos e caprinos. Tese
544 (Doutorado Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
545 Recife, 2008.

546

547 MELO, C.B.; LEITE, R.C. Papilomatose bovina. *Ciência Veterinária nos Trópicos*,
548 v.6, n.1, p.12, 2003.

549

550 MITIDIERO, A.M.A. Potencial do uso de Homeopatia, bioterápicos e fitoterapia
551 como opção na bovinocultura leiteira: avaliação dos aspectos sanitários e de
552 produção. 2002. 132f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas - Programa de
553 Pós Graduação em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina,
554 Florianópolis, 2002.

555

556 MOLINA, ADRIANA LOPES; TOBO, PATRÍCIA RENOVATO. Série Biologia
557 Molecular atualização parte 2: uso das técnicas de biologia molecular para
558 diagnóstico. *Revista Albert Einstein*, 2004.

559

560 MONTEIRO, V.C. Uso da *thuya occidentalis* no tratamento da papilomatose bovina:
561 aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares. 2007. 118f. Tese (Doutorado
562 Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

563

564 MONTEIRO, V. L. C. Uso da *Thuya occidentalis* no tratamento da papilomatose
565 bovina: aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares. *Medicina Veterinária*, v.1,
566 n.1, p.93-94, 2011.

567

568 MURO, L.; BOTTURA, C.; PICCININ, A. Papilomatose bovina. *Revista Científica*
569 *Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.6, n.10, 2008.

570 Disponível em: <[http://files.ricardo-martins-santos.webnode.com/200000147-](http://files.ricardo-martins-santos.webnode.com/200000147-d396cd490c/Papilomav%C3%ADrus.pdf)
571 [d396cd490c/Papilomav%C3%ADrus.pdf](http://files.ricardo-martins-santos.webnode.com/200000147-d396cd490c/Papilomav%C3%ADrus.pdf)>. Acesso em: 20 mar. 2015.

572

573 QUEIROZ, A.O., XAVIER, S.C.C., FARIA, K.G., BERNARDO, R.R., LEITÃO,
574 T.C.A. Avaliação do bioterápico *Trypanosoma cruzi* 30 DH: um estudo *in vivo*.
575 *Cultura Homeopática*, v.17, p.9-13, 2006.

576

577 ROPERTO, S., RUSSO, V., LEONARDI, L., MARTANO, M., CORRADO, F.,
578 RICCARDI, M. G., ROPERTO, F. Bovine papillomavirus type 13 expression in the
579 urothelial bladder tumours of cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015.
580 doi:10.1111/tbed.12322.

581

582 RUIZ, V., MOZGOVOJ, M.V., DUS SANTOS, M.J., WIGDOROVITZ, A.
583 Plant-produced viral bovine vaccines: what happened during the last 10 years?. *Plant*
584 *Biotechnology Journal*, p.1-7, 2015.

585

586 SANTIN, A.P.I.; BRITO, L.A.B. Estudo da papilomatose cutânea em bovinos
587 leiteiros: comparação de diferentes tratamentos. *Ciência Animal Brasileira*, v.5, n.1,
588 p.41-47, 2006.

589

590 SILVA, A.M.C.P., SCHWARTZ, F.F., CARDOSO, M.V., CESAR, A.T.,
591 SOLLERO, P.A. Uso de bioterápico de *Mycoplasma spp.* em rebanho bovino
592 leiteiro. *Cultura Homeopática*, v.4, n.13, p.43-47, 2005.

593

594 SILVA, M.A., PONTES, N.E., DA SILVA, K.M., GUERRA, M.M., FREITAS,
595 A.C. Detection of bovine papillomavirus type 2 DNA in commercial frozen semen of
596 bulls (*Bos taurus*). *Animal. Reproduction. Science*, v.129, p.146-151, 2011.

597

598 SIQUEIRA, C.M. Alterações celulares induzidas por um novo bioterápico dotipo
599 nosódio vivo sobre as linhagens MDCK E J774.G8. 2009.128f. Dissertação
600 (Mestrado – Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio
601 de Janeiro, 2009.

602

603 WOSIACKI, S.R., CLAUS, M.P., ALFIERI, A.F., ALFIERI, A.A. Bovine
604 papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic
605 haematuria. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101, n.6, p.635-638, 2006.

606

607 YAGUIU, A, CARVALHO, C., FREITAS, A.C., GÓES, L.G.B. Papillomatosis in
608 cattle: *in situ* detection of bovine papillomavirus DNA sequences in reproductive
609 tissues. *Brazilian Journal of Morphology Science*, v.23, p.525-529, 2006.

610