

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PAPILOMAVÍRUS ABRANGENDO
TRÊS DIFERENTES GÊNEROS IDENTIFICADOS EM UMA LESÃO
EPITELIAL DE BOVINO**

MÁRCIA HELENA JORGENS PRADO

Porto Alegre, fevereiro de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PAPILOMAVÍRUS ABRANGENDO
TRÊS DIFERENTES GÊNEROS IDENTIFICADOS EM UMA LESÃO
EPITELIAL DE BOVINO**

MÁRCIA HELENA JORGENS PRADO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias pelo Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Cláudio Wageck Canal

Porto Alegre, fevereiro de 2017

A todos que acreditaram, incentivaram e acompanharam esta
minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, professor Cláudio Wageck Canal, pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Virologia Veterinária Cíntia e Flávio por todo conhecimento científico e confiança em mim depositada. Ana Cristina, uma grande amiga e colega querida que eu tive a oportunidade de conviver durante esses dois anos. Samuel e Matheus, pessoas incríveis e inteligentes que me ajudaram muito, foram de suma importância para o resultado final deste trabalho. Mariana, Christian, Simone, Renata pessoas queridas que tive o prazer do convívio diário. Sou muito grata a este Laboratório que me acolheu com tanto carinho, levo vocês no coração!

Agradeço ao meu amor Gabriel por ser meu melhor amigo, ouvinte, conselheiro, incentivador e minha maior força durante este mestrado. Te amo!

Agradeço aos meus pais pela educação e assistência durante toda a minha vida.

Agradeço à minha amada irmã Mayara que sempre me encorajou nos momentos difíceis e compartilhou a alegria dos momentos de vitória. Tu és única, maninha!

À Marcela, amiga muito especial que a UFRGS me proporcionou conhecer.

À Eureka, minha companheirinha de quatro patas, que sempre esteve ao meu lado durante as horas de estudo, e fez com que eu nunca me sentisse sozinha.

A todos que participaram direta ou indiretamente durante a realização desta dissertação.

Obrigada a todos, de coração!

RESUMO

Os papilomavírus constituem uma extensa família de vírus associados a lesões epiteliotrópicas, assim como acometem o tecido mucoso onde podem causar tumores benignos que podem evoluir para a malignização. A papilomatose bovina é uma doença economicamente relevante, já que há a desvalorização dos animais a serem comercializados devido à aparência e depreciação do couro. Em humanos, a identificação dos tipos de papilomavírus (HPV) envolvidos bem como o relato de co-infecções são bem estabelecidos. Já foram descritos na literatura mais de 200 tipos de HPVs, o que ainda é pouco explorado na área da Medicina Veterinária, em que somente 21 tipos de papilomavírus bovino (BPV) foram caracterizados até o momento. A presente dissertação visou investigar a diversidade de BPV presentes em um papiloma de um bovino oriundo do Estado de Rondônia. A partir do DNA extraído da lesão, foi realizada a *rolling circle amplification* (RCA) seguida do sequenciamento de última geração (Illumina MiSeq). O emprego dessas metodologias culminou na identificação do BPV13, que atualmente é bem caracterizado, e de três prováveis novos tipos de BPVs que haviam sido descritos em um único estudo recente. Estes resultados confirmam a presença de co-infecção em lesões de papilomatose bovina e demonstram que estas técnicas possibilitaram a detecção de espécies que não são identificadas pelos métodos convencionais. Este conhecimento sobre a diversidade de BPV servirá de base para o melhor entendimento da biologia do vírus e para a geração de vacinas profiláticas ou terapêuticas eficazes.

Palavras-chave: papilomavírus, papilomatose, bovino, co-infecção, vacina.

ABSTRACT

Papillomaviruses are an extensive family of viruses associated with epitheliotropic lesions, as well as affecting mucosal tissue where they can cause benign tumors that may progress to malignancy. Bovine papillomatosis is an economically relevant disease, since there is a devaluation of the animals to be marketed due to the appearance and depreciation of the leather. In humans, the identification of the types of papillomavirus (HPV) involved as well as the reporting of co-infections is well established. More than 200 types of HPV have been described in the literature, which is still little explored in the area of Veterinary Medicine, in which only 21 types of bovine papillomavirus (BPV) have been characterized. This study aimed to investigate the diversity of BPV present in a papilloma of a bovine animal from the State of Rondônia. From the DNA extracted from the lesion, the rolling circle amplification (RCA) was performed followed by the last generation sequencing (Illumina MiSeq). The use of these methodologies culminated in the identification of BPV13, which is currently well characterized, and of three putative new BPVs types that had been described in a single recent study. These results confirm the presence of co-infection in bovine papillomatosis lesions and demonstrate that these techniques enabled the detection of species that are not identified by conventional methods. This knowledge on BPV diversity will serve as a basis for a better understanding of the biology of the virus and for the generation of effective prophylactic or therapeutic vaccines.

Key Words: Papillomaviruses, bovine papillomatosis, co-infection, vaccines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da organização do capsídeo viral e suas proteínas nos papilomavírus.....	14
Figura 2: Representação linear do genoma do BPV-1.....	16
Figura 3: Árvore filogenética dos papilomavírus baseada na sequência completa da ORF L1.....	18
Figura 4: Representação diagramática da infecção do tecido epitelial estratificado por papilomavírus.....	22
Figura 5: Esquema de lesões papilomatosas em diferentes regiões do corpo de um bovino.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Esquema da classificação das espécies e tipos de papilomavírus bovino dentro dos respectivos gêneros.....	19
Tabela 2: Esquema dos tipos de papilomavírus bovinos e as respectivas lesões associadas.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitro
°C	Graus Celsius
BPV	Papilomavírus bovino
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ds	<i>Double strand</i> (fita dupla)
dNTP	Desoxinucleosídeo trifosfato
E	Early (precoce)
EcPV	Equus caballus papilomavirus
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético sal sódico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EserPV	Epitesicus serotimus papilomavirus
HPV	Papillomavirus Humano
kg	Kilograma
L	<i>Late</i> (tardio)
LCR	<i>Long control region</i> (Região longa de controle)
MaPV	Mesocricetus auratus papilomavirus
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MmiPV	Micromys minutus papilomavirus

NGS	<i>Next generation sequencing</i> (Sequenciamento de última geração)
nt	Nucleotídeo
ORF	<i>Open reading frame</i> (Fase aberta de leitura)
OvPV	Ovis aries papilomavírus
pA	Sítio de poliadenilação
pA _E	Sítio de poliadenilação precoce
pA _L	Sítio de poliadenilação tardio
PaVE	<i>Papillomavirus episteme</i>
pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pmol	Picomol
PmPV	Peromyscus papilomavírus
PV	Papilomavírus
RCA	<i>Rolling circle amplification</i> (Amplificação por círculo rolante)
seg	Segundos
TBE	Tampão Tris, ácido bórico, EDTA
TE	Tris-EDTA
UV	Ultravioleta
V	Volts
VLP	<i>Virus like particles</i> (Partículas semelhantes à vírus)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 ESTRUTURA VIRAL DOS PAPILOMAVÍRUS	14
2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS PAPILOMAVÍRUS	15
2.3 PROTEÍNAS VIRAIS.....	16
2.4 CLASSIFICAÇÃO DOS PAPILOMAVÍRUS	17
2.5 EPIDEMIOLOGIA	19
2.6 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS	21
2.7 CO-INFECÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE BPVs.....	25
2.8 TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO.....	26
2.9 IMUNOPROFILAXIA.....	27
3 MANUSCRITO	29
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
5 REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho de aproximadamente 210 milhões de cabeças de gado, configurando o segundo maior produtor mundial de carne. Entretanto, alguns entraves ainda prejudicam a balança comercial agropecuária, tais como a febre aftosa e a papilomatose bovina (CARVALHO et al. 2012). Pesquisas estimam que, por não haver estudos publicados, 60% do rebanho bovino brasileiro está infectado com algum tipo de papilomavírus bovino (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 et al. 2014).

A papilomatose bovina é uma enfermidade infecto-contagiosa crônica, desenvolvida pela infecção do BPV de caráter tumoral benigna e natureza fibroepitelial, caracterizando-se por apresentar lesões localizadas na pele (verrugas ou papilomas) e mucosa (condilomas), apresentando diferentes morfologias (pedunculada, plana, grão de arroz e couve-flor) na região do úbere, mucosa e epitélios de revestimento (SANTIN et al. 2004). Entretanto, também tem sido atribuído a alguns papilomavírus (PV) o desenvolvimento de lesões malignas, como o caso da Hematúria Enzoótica com a expressão da oncoproteína E5 do BPV2 na maioria dos tumores de animais afetados (ROPERTO et al. 2008). As lesões ocasionadas pela infecção com BPV determinam prejuízos econômicos consideráveis à bovinocultura tanto por perdas diretas, causadas por mortes dos animais, quanto indiretas, representadas por reduções na produtividade e no valor comercial dos animais e subprodutos, como o couro (ALFIERI et al. 2012).

Os estudos de papilomavírus em humanos (HPV) se encontram muito a frente quando comparados aos do BPV. Atualmente, em humanos mais de 200 tipos de HPV foram totalmente sequenciados, caracterizados e catalogados, contrastando com o baixo número de BPV encontrados em bovinos, que compreende somente 21 tipos (<http://pave.niaid.nih.gov>). Apesar de ser um agente etiológico importante, a detecção e a caracterização de PV em animais é ainda deficiente (MUNDAY et al. 2007; RECTOR et al. 2013). Esse fato se deve, em parte, pelas técnicas de detecção moleculares que utilizam testes baseados no conhecimento prévio de sequências genômicas (FREITAS et al., 2013) e ao pequeno número de estudos em papilomavírus não-humanos.

Portanto, este trabalho objetivou investigar a diversidade de BPVs presentes em uma lesão de papilomatose bovina. Foram empregadas metodologias (amplificação randômica de genomas circulares e sequenciamento de última geração) que propiciaram a confirmação da presença de quatro BPVs co-infectando uma lesão e demonstraram que estas técnicas podem possibilitar a detecção de espécies que não são identificadas pelos métodos convencionais. Este conhecimento visa contribuir para o conhecimento da diversidade de PVs que acometem os animais e para a geração de vacinas profiláticas ou terapêuticas eficazes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura viral dos papilomavírus

Os papilomavírus (PV) são vírus oncogênicos epitéliotrópicos, pequenos e complexos que pertencem à família *Papillomaviridae* (BERNARD et al. 2010; DE VILLIERS et al. 2004). Esses vírus são desprovidos de envelope lipoprotéico, apresentam simetria icosaédrica e são constituídos por um genoma circular de DNA dupla fita (dsDNA) não segmentado com aproximadamente 8000 pares de bases (pb), que acometem mamíferos, inclusive humanos, aves e répteis (BERNARD et al. 2010; DE VILLIERS et al. 2004; RECTOR et al. 2013) (Figura 1).

A organização gênômica dos vários papilomavírus é extremamente similar. O vírion possui 55 a 60 nm de diâmetro (BORZACCHIELLO et al. 2008). O genoma dos PV está conjugado com histonas, formando um complexo semelhante à cromatina (ALFIERI et al. 2012). A dsDNA está contida em um capsídeo composto de 72 capsômeros (SCHILLER; MÜLLER, 2015). Sessenta destes capsômeros se ligam de forma hexavalente e doze de forma pentavalente. Cada capsômero é composto por duas proteínas codificadas pelo vírus, a proteína principal, L1, e a proteína secundária, L2 (PFISTER et al. 1978).

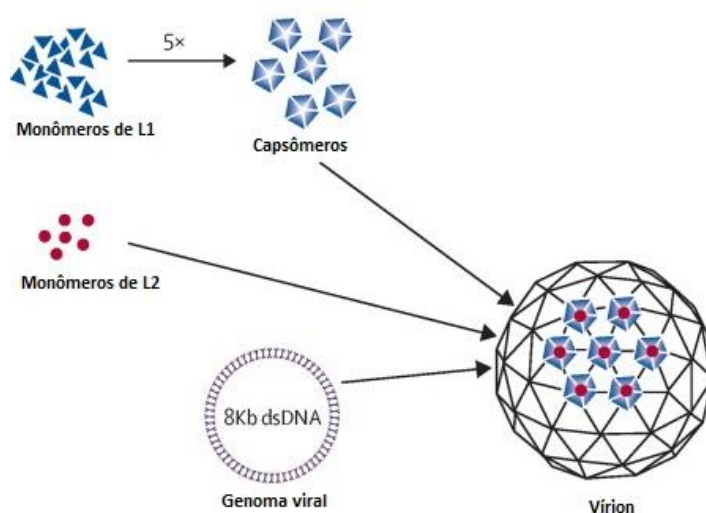


Figura 1. Esquema da organização do capsídeo viral dos papilomavírus e suas proteínas. Fonte: adaptado de SCHILLER; MÜLLER, 2015.

2.2 Organização genômica dos papilomavírus

O genoma dos PVs é dividido em três regiões: a região LCR (*Long Control Region* ou Região Longa de Controle), e duas regiões que formam as fases abertas de leitura (ORF) correspondentes aos genes precoces (E) e tardios (L). As ORFs são classificadas como não-estruturais ou precoces (E, do inglês *early*) e estruturais ou tardias (L, do inglês *late*), de acordo com a fase da diferenciação celular em que são expressas. A região E representa mais de 50% do genoma e codifica proteínas que são necessárias para a replicação e transcrição do DNA viral, enquanto que a região L ocupa 40% do genoma do vírus e codifica proteínas que formam a estrutura do capsídeo viral (CAMPO et al. 1997; FREITAS et al. 2011).

LCR é uma região que possui um segmento de aproximadamente 500-1000 nucleotídeos (nt), que compreende aproximadamente 10% do genoma viral (LAZARCZYK et al. 2009), não codifica nenhuma proteína, mas contém a origem da replicação e os sítios de ligação de múltiplos fatores de transcrição do material genético (BORZACHIELLO et al. 2007; LETO et al. 2011; ZHENG et al. 2006).

A região E contém até seis ORFs, e o segmento L contém até três ORFs. Os genes precoces (*E1, E2, E5, E6, E7 e E8*) codificam as proteínas (que recebem os mesmos nomes dos genes) envolvidas tanto na replicação e transcrição do DNA viral quanto na transformação celular, prevenindo a apoptose celular em resposta à entrada não programada na fase S (CORTEGGIO et al. 2013; LAMBERT et al. 1991; VENUTI et al. 2011). Por outro lado, os genes tardios (*L1 e L2*) codificam as proteínas do capsídeo viral L1 e L2 (Figura 2).

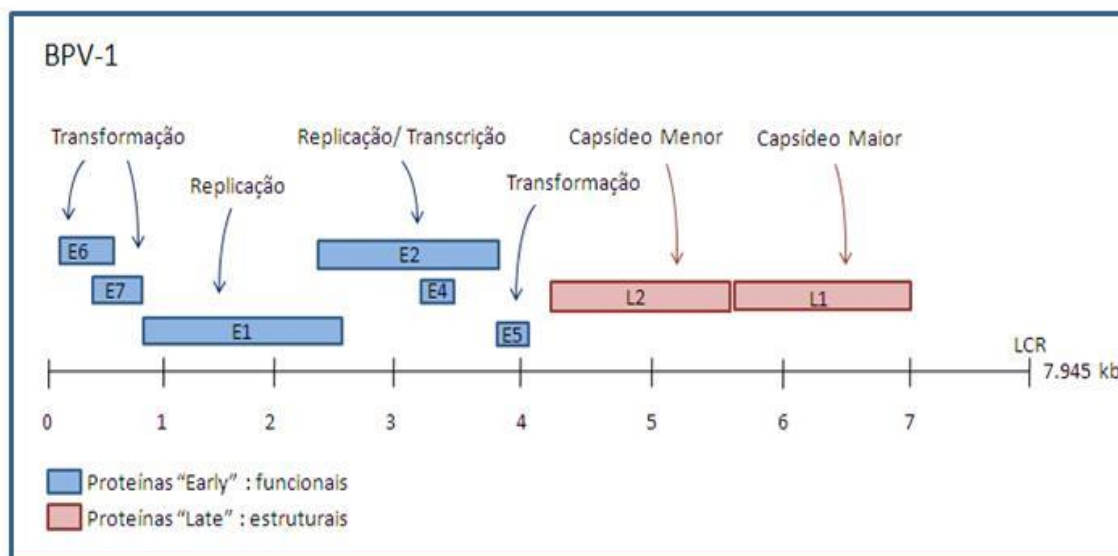


Figura 2. Representação linear do genoma de BPV-1 com as principais funções de cada região gênica ou de seus produtos. Fonte: Modificada de CAMPO (2006) por DINIZ (2009).

2.3 Proteínas virais

As principais proteínas para replicação do DNA viral são as proteínas E1 e E2, que são responsáveis pelos primeiros passos na iniciação da transcrição e replicação (LAMBERT et al. 1991; MÜNGER et al. 2002; SANDERS et al. 2001). Enquanto a proteína E1 atua na replicação do DNA viral, a proteína E2 ancora na LCR ativando ou reprimindo a transcrição dos genes virais e, desta forma, controlando a atividade transcricional (BAXTER et al. 2005; HOWLEY et al. 2001). As proteínas E2 são estruturalmente bem conservadas entre os diferentes tipos de PV, sendo bem semelhantes em tamanho com aproximadamente 350 a 400 aminoácidos (HARRIS et al. 1999). Essas proteínas (E1 e E2) também tem papel importante na segregação do genoma viral para as células filhas e na manutenção da sua integridade (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015; DOORBAR et al. 2012).

A correlação entre as infecções por PVs e os processos tumorais está associada à expressão de oncoproteínas virais E5, E6 e E7. Estas proteínas atuam na alteração das funções dos genes supressores de tumores e das proteínas de controle do ciclo celular, podendo induzir alterações na cromatina da célula hospedeira (STEWART;

BACCHETTI, 1991). As proteínas estruturais L1 e L2, compõem o capsídeo (MÜNGER; HOWLEY, 2002). Somente as principais ORFs *E1*, *E2*, *L1* e *L2* estão presentes em todos os papilomavírus já descritos (RECTOR; VAN RANST, 2013) e, teoricamente, essas proteínas poderiam realizar sozinhas as tarefas básicas de replicação, regulação, estabilização e empacotamento do DNA viral, levando à liberação dos vírions (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

2.4 Classificação dos papilomavírus

Esta grande família viral é formada por vírus filogeneticamente classificados em 49 gêneros que são subdivididos em várias espécies, tipos, subtipos e variantes (BERNARD et al. 2010; DE VILLIERS et al. 2004; ICTV, 2016). Atualmente, a sequência de nucleotídeos do gene L1 é utilizada para a classificação dos PV por ser o gene mais conservado do genoma (BERNARD et al. 2010; DE VILLIERS et al. 2004). Um novo tipo de PV é considerado quando o seu genoma completo é totalmente sequenciado e a ORF L1 difere em mais de 10% dos tipos de PV anteriormente descritos. As espécies de PV compartilham entre 71% e 89% de identidade de nucleotídeos nesta mesma ORF. As similaridades menores do que 60% definem um novo gênero. Um subtipo é definido quando a diferença entre a ORF L1 é entre 2% e 10%, e uma variante viral ocorre quando esta diferença é menor do que 2% (BERNARD et al. 2010; DE VILLIERS et al. 2004).

Atualmente, os BPV estão classificados em cinco gêneros, cinco espécies e 21 tipos. O gênero *Deltapapillomavirus*, é constituído pela espécie *Deltapapillomavirus 4* (compreendendo o BPV1, 2 e 13) e o BPV tipo 14; *Epsilonpapillomavirus*, pela espécie *Epsilonpapillomavirus 1* (BPV5 e BPV8); *Dyokappapapillomavirus* pelo BPV16; *Dyoxipapillomavirus*, pela espécie *Dyoxipapillomavirus 1* (BPV7) e o gênero *Xipapillomavirus*, pelas espécies *Xipapillomavirus 1* (BPV3, 4, 6, 9, 10 e 11) e *Xipapillomavirus 2* (BPV12) e o BPV tipo 15, 17 e 20; BPV18, BPV19 e BPV21 ainda não foram classificados em nenhum gênero (<http://pave.niaid.nih.gov>) (Tabela 1). A Figura 3 mostra a atual disposição dos grupos de BPV dentre os gêneros de papilomavírus descritos e os prováveis novos tipos identificados e caracterizados em um estudo anterior (DAUDT et al. 2016).

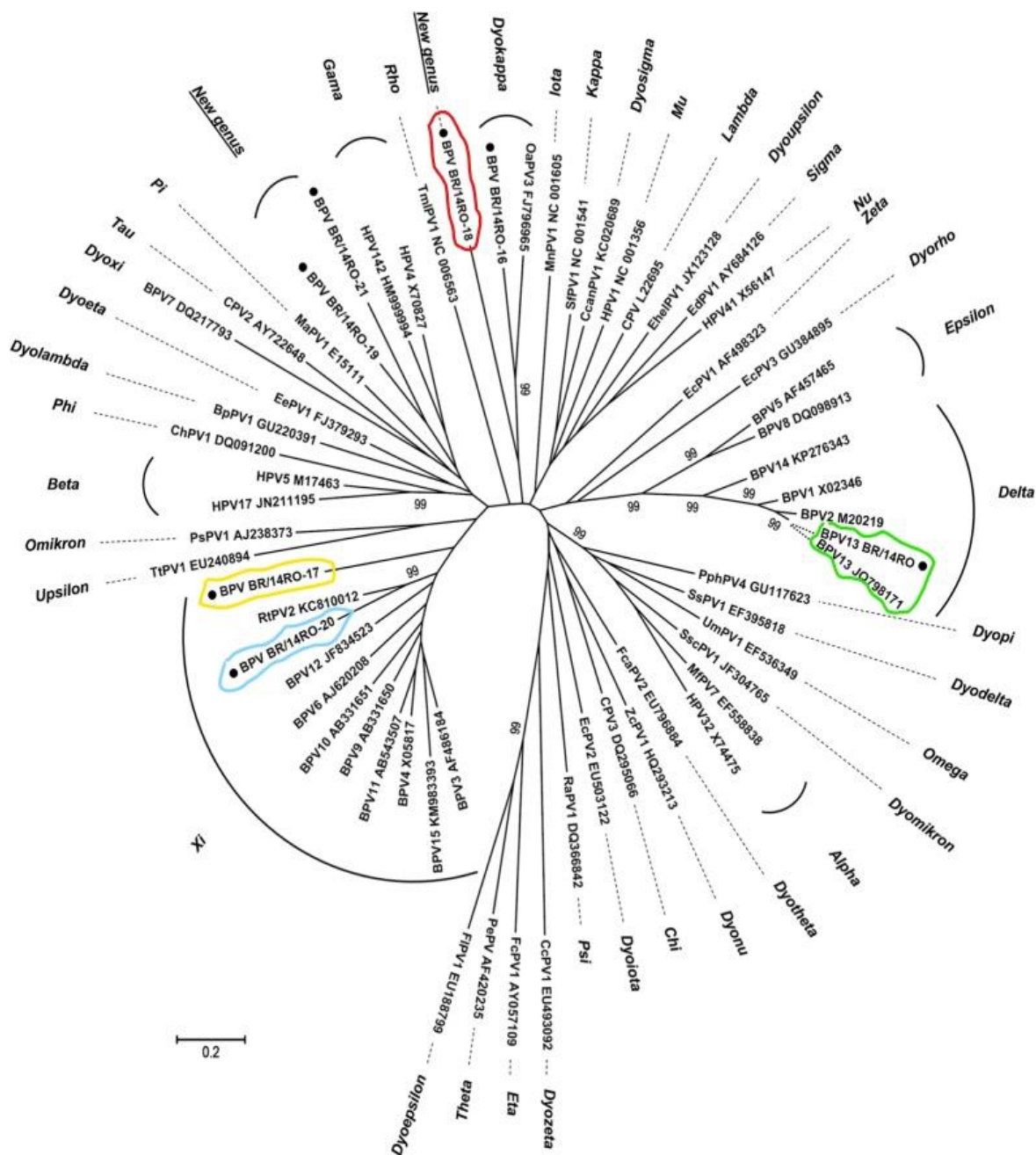


Figura 3: Árvore filogenética dos papilomavirus baseada na sequência completa da ORF L1. Fonte: adaptado de DAUDT (2016)

Tabela 1. Esquema da classificação das espécies e tipos de papilomavírus bovino dentro dos respectivos gêneros. * Representa os tipos ainda não classificados dentro de uma espécie.

Gênero	Espécie	Tipos de BPV
<i>Deltapapillomavirus</i>	<i>Deltapapillomavirus 4</i>	1, 2, 13
	*	14
<i>Xipapillomavirus</i>	<i>Xipapillomavirus 1</i>	3, 4, 6, 9, 10, 11
	<i>Xipapillomavirus 2</i>	12
	*	15, 17, 20
<i>Epsilonpapillomavirus</i>	<i>Epsilonpapillomavirus 1</i>	5, 8
<i>Dyoxipapillomavirus</i>	<i>Dyoxipapillomavirus 1</i>	7
<i>Dyokappapapillomavirus</i>		16
<i>Unclassified</i>		18, 19, 21

2.5 Epidemiologia

A papilomatose bovina tem distribuição mundial e, embora a mortalidade seja baixa, ela pode causar surtos com alta morbidade. No Brasil, esta doença apresenta um relevante impacto econômico, como não é de notificação obrigatória pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), existe a dificuldade de controle da doença por não haver dados precisos sobre a extensão do comprometimento do rebanho e sobre os tipos virais prevalentes, diferenças regionais e principais consequências clínicas (SMITH et al. 2006; BLOOD, RADOSTITS e GAY, 1991; SANTIN, HERMONAT, RAVAGGI et al. 2001). A doença não é letal, mas pode levar a morte do animal pela grande presença de papilomas, causando o enfraquecimento do animal e propiciar miasas devido a traumatismos causados nos papilomas (SCHUCH et al. 2001). Por outro lado, como muitos vírus, o PV pode estabelecer uma infecção latente (CAMPO et al. 1994; DOORBAR et al. 2013; ROPERTO et al. 2010) e ser encontrado

em pele saudável (OGAWA et al. 2004; RECTOR; VAN RANST, 2013), assim como em sangue, esperma e outras secreções em bovinos (LINDSEY et al. 2009).

Os papilomas causam prejuízos tanto em rebanho leiteiro como de corte tais como, cegueira, emagrecimento e atraso no desenvolvimento corpóreo, desvalorização do couro, transtornos de ordenha das vacas ou sugação dos bezerros lactentes e consequentemente diminuição da produtividade dos rebanhos bovinos (OLIVEIRA et al. 2008). Além do mais, ocorre ainda sensível depreciação do valor do animal, dificuldade de comercialização e de problemas relacionados com a capacidade reprodutiva, principalmente quando a localização do papiloma é observada na genitália. Animais com lesões nos tetos não podem ser adequadamente ordenhados, nem podem amamentar os bezerros. Frequentemente, os papilomas pedunculados sofrem fissuras, com infecções oportunistas, onde ocorre perda de produtividade (RADOSTITS, GAY, BLOOD et al. 2000; CAMPO et al. 2002). Dassie et al. (1999) e Ward et al. (1989) relatam os problemas comerciais relacionados à papilomatose bovina e ressaltam que a presença de verrugas, além de dificultar a comercialização, impede o animal de participar de feiras e exposições.

O vírus se dissemina por contato direto ou indireto, sexual, fômites (agulhas, brincadores e outros aparelhos contaminados), instalações e possivelmente insetos (CAMPO et al. 1994; FINLAY et al. 2009; REID et al. 1994). Parte do genoma do BPV1 já foi detectado em várias espécies diferentes de moscas, incluindo espécies sugadoras e não sugadoras, sugerindo que elas possam ser vetores dos papilomavírus (FINLAY et al. 2011; FINLAY et al. 2009). Também existem evidências que sugerem que a maioria dos bovinos seja contaminada com BPV2 e os linfócitos possam ser uma fonte de infecção (MUNDAY et al. 2014), disseminando o vírus através da via hematogênica (ROPERTO et al. 2008). Outros estudos demonstraram a presença de BPV nos ovários, útero, oócitos, sangue, leite, urina, líquido seminal e espermatozóide de bovinos infectados (DE CARVALHO et al. 2003; LINDSEY et al. 2009).

A manifestação do BPV no trato digestório é sugerida pela interação entre o vírus da papilomatose e a ingestão de samambaia *Pteridium spp.*, proporcionando o desenvolvimento de carcinomas devido à imunodepressão que limitaria as respostas imunológicas capazes de controlar tumores (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008; BORZACCHIELLO et al. 2003; CAMPO et al. 1997). Acredita-se que os PV são

estritamente espécie-específicos (CAMPO et al., 2006), embora o BPV1, 2 e 13 também possam infectar equinos (BOGAERT et al. 2008; LUNARDI et al. 2013; MUNDAY; KIUPEL, 2010; NASIR; CAMPO, 2008) e o HPV 9 já tenha sido descrito em um papiloma em felino (MUNDAY et al. 2007).

2.6 Patogenia e sinais clínicos

A propagação do PV acontece em células epiteliais em diferenciação, podendo infectar fibroblastos, queratinócitos e células epiteliais (CAMPO et al. 2002) assim como junções entre diferentes tipos de epitélios, que são locais vulneráveis (DOORBAR et al. 2012), formando projeções digitiformes microscópicas ou macroscópicas (SILVA et al. 2004). O PV infecta o epitélio escamoso estratificado da pele e mucosas causando lesões benignas as quais podem progredir para neoplasias (HOWLEY; LOWY, 2001). Acredita-se que para a infecção ser estabelecida é necessário a ocorrência de um microtrauma ou erosão da epiderme para que o vírus possa infectar o epitélio basal (DOORBAR et al. 2012).

Uma vez que o PV infecta a célula basal, o genoma viral é incorporado dentro do núcleo depois da célula completar um ciclo mitótico, e permanece lá como um cromossomo episomal (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015; DOORBAR et al. 2012). Os genes virais são expressos na fase proliferativa, e a suas expressões completas resultam na produção de capsídeos virais, somente após o início da diferenciação celular nas camadas superiores do epitélio. As proteínas E6 e E7 parecem mediar a proliferação das células das camadas basal e parabasal e a liberação do vírus ocorre durante a descamação das células infectadas da superfície das lesões. As células infectadas proliferam e a diferenciação é demorada (DOORBAR et al. 2012). Um esquema da infecção por PV é ilustrado na Figura 4.

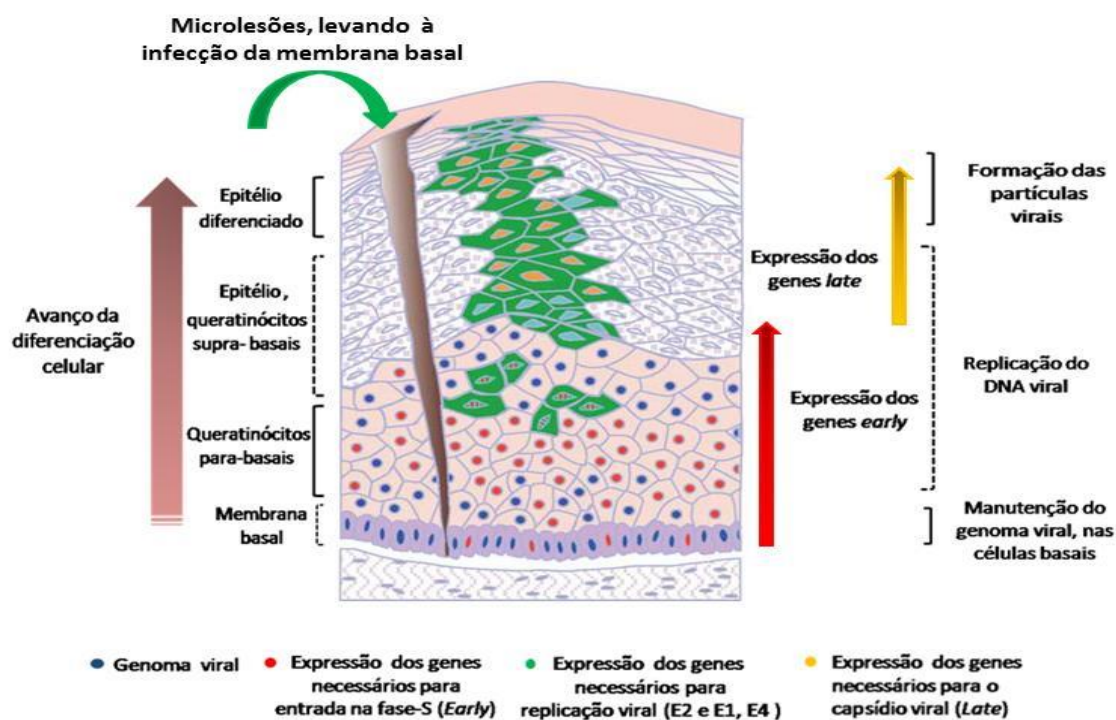


Figura 4. Representação diagramática da infecção do tecido epitelial estratificado por papilomavírus. Estão representados os diferentes estágios do ciclo viral com seu respectivo padrão de expressão gênica. Fonte: Modificada de DOORBAR (2005) por MELO (2009)

As infecções crônicas assintomáticas e os papilomas causados pelos PV parecem estar ligados à estratégia de transformação celular e propagação dos vírions no epitélio e, provavelmente, também às diferentes relações entre eles e o sistema imune do hospedeiro (DOORBAR et al. 2012). Os fatores genéticos do hospedeiro, que controlam o sistema imune inato e as respostas das células T efectoras podem determinar o aumento do risco de infecção persistente (SHAFTI-KERAMAT et al. 2009). A fraca resposta imune dos bovinos ao BPV pode estar relacionada a dois fatores: ao fato do ciclo de infecção do vírus ser não lítico e, portanto não provocar nenhum sinal pró-inflamatório que ativa as células dendríticas e induza sua migração para o local da infecção e também pode estar relacionada ao fato do ciclo de vida do vírus ser restrito ao epitélio (KANODIA et al. 2007; CAMPO et al. 2006). Geralmente, as infecções causadas por PV regridem naturalmente e o exame histológico das lesões revela uma intensa infiltração de linfócitos na derme e no epitélio (CAMPO et al. 2003), reforçando o papel

da resposta imune celular no combate ao agente infeccioso (O'BRIEN; SAVERIA CAMPO, 2002).

Os PVs já foram descritos em várias ordens de mamíferos, répteis e aves, oriundos tanto de lesões papilomatosas quanto de pele saudável (ANTONSSON; HANSSON, 2002; RECTOR; VAN RANST et al. 2013). Nos bovinos, os papilomas são encontrados em diversas áreas do corpo desses animais (cabeça, pescoço, dorso, ventre, abdome, úbere, mucosas do trato digestivo e de bexiga urinária) ou podem se apresentar de maneira generalizada (CAMPO et al. 1997; CARVALHO et al. 2012; OGAWA et al. 2004; TOZATO et al. 2013).

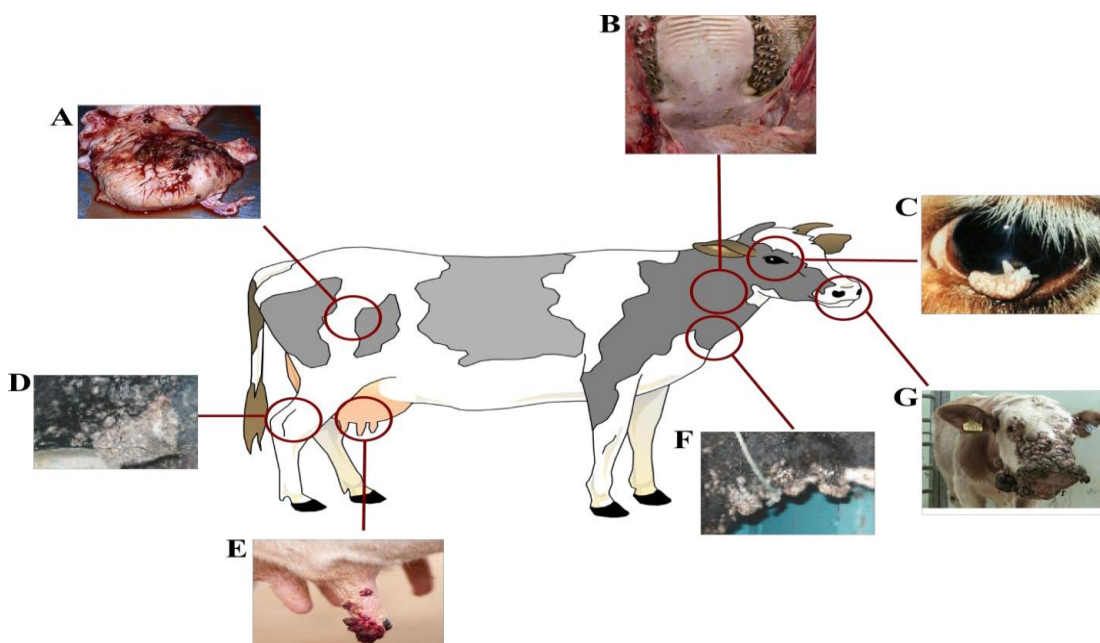


Figura 5. Aspecto de lesões papilomatosas em diferentes regiões do corpo de um bovino. Adaptado de Freitas e colaboradores (de Freitas et al., 1994). A) Carcinoma de bexiga urinária (Corteggio et al., 2013). B) Papilomas no palato mole (<http://coral.ufsm.br>). C) Papiloma na região ocular (<http://www.dpi.nsw.gov.au>). D) Verrugas na região do jarrete (Freitas et al., 2011). E) Papilomas nos tetos (Luciano Coca - www.estadao.com.br). F) Verrugas na região da barbela (Freitas et al., 2011). G) Verrugas na região da boca e focinho (<http://www.nadis.org.uk>)

Embora alguns autores hipotetizem que diferentes tipos de BPV tenham predileção por diferentes localidades anatômicas dos bovinos, os BPV tem sido associados com as vários tipos de lesões e localidades corporais conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Esquema dos tipos de papilomavírus bovino e as respectivas lesões associadas.

TIPOS DE PAPILOMAVIRUS BOVINO	LESÕES
BPV1	Fibropapilomas de teto e pênis
BPV2	Papilomas cutâneos, trato digestivo e tumores de bexiga
BPV3	Papilomas cutâneos
BPV4	Papilomas do trato gastrointestinal superior e papilomas cutâneos
BPV5	Fibropapilomas de úbere
BPV6	Papilomas de teto
BPV7	Papiloma cutâneo e teto
BPV8	Papiloma cutâneo
BPV9	Papiloma escamoso do úbere e teto
BPV10	Papiloma escamoso do úbere e teto
BPV11	Papilomas cutâneos
BPV12	Papiloma epitelial de língua e associado a papilomas cutâneos
BPV13	Papilomas cutâneos
BPV14	Fibropapilomas
BPV15	Fibropapilomas

2.7 Co-infecção de diferentes tipos de BPVs

Muitos estudos sobre HPV objetivaram entender a prevalência deste vírus em determinadas áreas, o que culminou com o conhecimento da co-infecção por diferentes tipos de HPVs causadores de câncer cervical e também auxiliou no conhecimento para desenvolver vacinas profiláticas e terapêuticas mais eficazes (MUÑOZ et al. 2003). No entanto, ainda existem poucos estudos que relatem a ocorrência de co-infecção com diferentes tipos de BPV. Na Índia e Alemanha, diferentes tipos de BPV foram identificados na mesma lesão (PANGTY et al. 2010; SCHMITT et al. 2010). No Brasil, a presença de BPV1,2,4 e 6 na mesma lesão também foi relatado (YAGUIU et al. 2006; CLAUS et al. 2007, 2009; LINDSEY et al., 2009) e atualmente têm-se detectado co-infecção com novos tipos de papiloma (DA SILVA et al. 2015; DAUDT et al. 2016).

A ocorrência da co-infecção por BPV em uma única amostra sugere que não há uma competição natural entre os diferentes tipos virais (SCHMITT et al. 2010). Entretanto, ainda não está claro se os diferentes tipos de BPV co-infectando as mesmas lesões são capazes de promover uma nova infecção. Alguns relatos descrevem que a infecção pelo BPV em sítios não característicos é abortiva por não produzir novos vírions (AMTMANN et al. 1980; LANCASTER et al. 1981; BOGAERT et al. 2008). Porém, muitos animais são constantemente afetados com papilomas em várias partes do corpo, o que pode ser consequência da co-infecção, que levaria a baixa da imunidade e dificuldade de regressão das lesões (FREITAS et al. 2011).

Estudos anteriores também ressaltaram a importância do conhecimento da ocorrência de lesões de papilomatose bovina causadas por diferentes tipos de BPVs em sítios de infecção diferentes no corpo do animal, promovendo aspectos diversos da lesão (CARVALHO et al. 2012), assim como lesões com morfologias características de infecção por determinado tipo viral sendo causada por outro tipo de BPV (CLAUS et al. 2009). O BPV 4 no estudo de Carvalho et al. (2012) foi encontrado em lesões cutâneas, entretanto este tipo viral é relacionado à infecção em mucosas e é responsável por câncer do trato digestivo superior. Já BPV 5 e 6, que estão relacionados a lesões nas tetas e úbere, foram relatados promovendo papilomas ao redor do olho e ombro de bovinos (CARVALHO et al. 2012). A presença de BPV 1 e 2 já foi relatada em outros tecidos como sangue e células reprodutivas (YAGUIU et al. 2006, 2008; DINIZ et al.

2009; LINDSEY et al. 2009). Os BPV 1 e 2 foram relatados co-infectando lesões em bovinos na Índia (LEISHANGTHEM et al. 2008; PANGTY et al. 2010). Assim como já foram encontrados cinco diferentes combinações de infecção múltiplas em bovinos (CLAUS et al. 2009). No Brasil altas incidências de BPV 3 foram relatadas, assim como presença de BPV tipo 2, 3, 4 e 10 na mesma lesão foi demonstrada (CARVALHO et al. 2012).

Como consequência, a classificação viral aceita antigamente sofreu alterações, visto que um dos parâmetros utilizados para distinção dos BPVs era o tipo de lesão associada ao tipo de papilomavírus. Devido ao desenvolvimento de novas metodologias que promoveram a genotipagem dos BPV, foi possível detectar e tipificar os papilomavírus bovinos presentes nas diferentes lesões, elucidando a capacidade de infecção em diferentes sítios (FREITAS et al. 2011).

2.8 Tratamento e diagnóstico

A vacina autógena é o tratamento mais comumente utilizado para a papilomatose bovina (SCHUCH et al. 2001). É feito um macerado com os papilomas do animal afetado e o vírus é inativado (AIELLO; ASA, 2001; SCHUCH et al. 2001), porém os resultados dependem do tipo de papiloma, da preparação da vacina e do estágio de evolução das lesões (SCHUCH et al. 2001). No Brasil, a vacina autógena tem sido utilizada como tratamento terapêutico para animais extensamente atingidos por papilomatose e apresenta resultados de, aproximadamente, 50% de recuperação. No entanto este tratamento, além de não ser muito eficaz, possui custo elevado (SILVA et al. 2004).

Os papilomas pequenos podem ser removidos cirurgicamente, podendo-se usar criocirurgia em papilomas grandes, porém, muitos regridem espontaneamente dentro de alguns meses sem tratamento (SMITH et al. 2006). Uma das formas de tratamento consiste na utilização de uma ou duas doses de clorobutanol, na dose de 50 mg/Kg, em solução alcoólica via subcutânea (SCHUCH et al. 2001).

As técnicas diagnósticas consistem em exame clínico, análise histopatológica (BETIOL et al. 2012) e detecção do DNA viral através de PCR, Southern blot, Dot blot, Reverse blot e hibridização in situ com sondas biotinizadas ou radiomarcadas (DEL

FAVA et al. 2001; LETO et al. 2011). O emprego de anticorpos monoclonais contra epítomos de BPV também constitui uma técnica diagnóstica por meio de imunoistoquímica (ELZEIN et al. 1991).

Entretanto, a identificação e tipificação do BPV através da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), empregando primers degenerados, seguido de purificação, sequenciamento e análise de similaridade de sequências através de programas computacionais e ferramentas virtuais como o BLAST, mostra-se o método mais sensível para a detecção viral (BORZACCHIELLO et al. 2003; CARVALHO et al. 2012; OGAWA et al. 2004; JELÍNK, TACHEZY et al. 2005; LETO et al. 2011; MONTEIRO et al. 2008; NASCIMENTO et al. 2012; ZHU et al. 2012).

2.9 Imunoprofilaxia

As pesquisas de vacinas contra o papilomavírus são prejudicadas pela incapacidade do vírus de replicar em cultivos celulares e também pela dificuldade de adaptação em cultivos de tecidos. 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 em bactérias e vacinas baseadas em VLPs (*Virus Like Particles*) (CAMPO et al. 1993).

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 et al. 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 et al. 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 são necessários estudos epidemiológicos capazes de identificar os tipos virais mais recorrentes no Brasil, e no mundo (CAMPO et al. 1996; NICHOLS; STANLEY, 2000; CARVALHO et al. 2012; ARALDI et al. 2014).

3 MANUSCRITO

O presente experimento já foi concluído e gerou o artigo científico a ser submetido na revista *Veterinary Research Communications* e intitulado "*Papillomavirus co-infection in a bovine papillomatous lesion: BPV13 and three recently papillomaviruses*". O manuscrito será apresentado a seguir.

Papillomavirus co-infection in a bovine papillomatous lesion: BPV13 and three recently discovered papillomaviruses

Márcia H. J. Prado¹, Cíntia Daudt¹, Flávio R. C. da Silva^{1,2}, Samuel P. Cibulski¹,
Matheus N. Weber¹, Ronaldo V. Leite Filho³, David Driemeier³, Fabiana Q. Mayer⁴,
Cláudio W. Canal¹

¹Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Av. Bento Gonçalves, 9090, Prédio 42.602, CEP 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil).

²Centro de Ciências Biológicas e da Natureza, Universidade Federal do Acre (Campus Universitário, BR 364, Km 04 - Distrito Industrial- CEP 69920-900, Rio Branco, Acre, Brazil).

³ Setor de Patologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Av. Bento Gonçalves, 9090, Prédio 42.602, CEP 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil).

⁴Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Estrada do Conde, 6000, CEP 92990-000, Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil).

¥Corresponding author: Cláudio Wageck Canal. E-mail: claudio.canal@ufrgs.br

Abstract

Papillomaviruses (PVs) are small circular double-stranded DNA viruses that belong to the *Papillomaviridae* family. Currently, 21 bovine papillomavirus (BPV) types have been fully characterized. Additionally, at least six putative new BPV genomes have been identified and reported. BPV co-infections are rarely reported, contrasting to human papillomaviruses (HPV), which are commonly identified in young or immunodepressed women. In the present study, we described four distinct bovine papillomavirus (BPV) types in one papillomatous lesion. The genomes were detected by rolling circle amplification coupled to next generation sequencing (NGS) in a bovine (*Bos taurus*) lesion from the Brazilian Amazon region. It was identified the well characterized BPV13, together with three putative new BPV types recently reported. The data presented herein reinforces that some putative BPV new types cannot be accessed by commonly applied PCR protocols and suggest that the knowledge of BPV co-infections can be underestimated due to the limitation of detection techniques.

Keywords: papillomavirus; bovine; co-infection; next generation sequencing.

Introduction

Papillomaviruses (PV) are non-enveloped icosahedral viruses which hold a supercoiled, circular and double-stranded DNA genome of about 8,000 bp. They belong to the large *Papillomaviridae* family which can infect a wide range of amniotes (Campo et al. 2002; Borzacchiello et al. 2008). *Papillomaviridae* family is composed by viruses phylogenetically assigned into 49 genera with several species, types, subtypes and variants. In cattle, bovine papillomaviruses (BPVs) can induce skin benign lesions at diverse anatomical locations. Also, when genetic and/or environmental factors are involved, the infection may result in malignant conversion with lesions within the mucosa of the urinary bladder and upper alimentary canal (Campo et al. 2002; Wosiacki et al. 2006). Currently, 21 BPV types have been characterized and classified in four genera: *Xipapillomavirus*, *Deltapapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus*, *Dyoxipapillomavirus* and *Dyokappapapillomavirus* (<http://pave.niaid.nih.gov>). In addition to these fully sequenced BPV types, numerous putative new BPV types have been identified worldwide (Claus et al. 2009; da Silva et al. 2016; Daudt et al. 2016).

The research of human PV (HPV) encompasses more than 200 types that are fully sequenced, characterized and cataloged. Besides that, co-infection in lesions of HPV have been reported using numerous molecular techniques that detect many distinct HPV types (Antonsson et al. 2000; Forslund et al. 2003; Longworth et al. 2004). In cattle only 21 BPV types have been characterized and classified, there is much less research in this field that reflect the vague BPV types and the few cases of BPV co-infection reported (Araldi et al. 2014; Carvalho et al. 2013; Batista et al. 2013; Daudt et al. 2016).

PVs are usually characterized by PCR amplicon sequencing, which is performed using degenerated primer pairs that amplify a relatively conserved L1 gene region from all known PV types and species (Nasir et al. 2008). Moreover, the extraordinary diversity of PV types that infect the animal skin combined with low numbers of PV types detected by degenerated primers (da Silva et al. 2015) indicate that these techniques allow the discovery of only closely related PVs from known genera. Rector et al. (2004) showed that application of multiply-primed RCA to clinical samples also resulted in the detection of viruses which could not be assigned to known virus families. The next generation sequencing (NGS) and RCA have enabled the identification of HPV co-infections and of four HPV types that were not detected by commercial assays (Meiring et al. 2012). Also, the same method used in a bovine papilloma lesion have identified six putative new BPV types that could not be detected by commonly used PCR protocols (Daudt et al. 2016).

Here we used multiply-primed RCA coupled with NGS in order to investigate the genetic BPV diversity in a bovine lesion from the Brazilian Amazon region. This report will contribute to the knowledge of BPV genetic diversity and co-infections.

Material and Methods

Sample, DNA extraction and rolling circle amplification (RCA)

One sample (09RO11) of a bovine skin wart from Rondônia state, Amazon region, Northern Brazil, was obtained and processed according to our previous studies (da Silva et al. 2015; Daudt et al. 2016). Briefly, approximately one gram of a papilloma sample was ground in 10 mL of phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.4), centrifuged at 720 x g for 10 minutes and 100 µL of the supernatant was stored at -20°C for DNA extraction. DNA was extracted using a silica based-protocol (da Silva et al, 2015).

In order to amplify the full circular PV genomes, randomly-primed rolling circle amplification (RCA) was performed as described by Dezen et al. (2009). Amplicons were analyzed by agarose gel electrophoresis as described by Daudt et al. (2016). Following RCA, the amplification products were purified using a Genomic DNA clean and Concentrator (Zymo Research). The quality and quantity of the DNA were assessed using Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific) and a Qubit fluorometer (Invitrogen), respectively.

Illumina sequencing

Purified RCA products were used to construct DNA fragment libraries for Illumina MiSeq™ sequencing. Libraries were prepared with one ng of RCA products using a Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina) and were paired-end sequenced using Illumina MiSeq™ instrument (2 x 150 nt with the Illumina v2 reagent kit).

High-throughput sequencing data analyses

The quality of the reads was accessed by FastQC. Low quality reads were trimmed using Geneious software (version 8.1.7). Different softwares were tested to

perform assemblies, including Geneious version 8.1.7, CLC Genomics Workbench version 8.5.1, Velvet version 1.2.10, Meta-Velvet and SPAdes 3.6. Best results were obtained with SPAdes 3.6 and this program was used in this study. All assemblies were confirmed by mapping reads to contigs generated by SPAdes 3.6 using Geneious version 8.1.7.

Open reading frame (ORF) predictions and genome annotations of the complete or near-full-length genomes were performed with aid of the Geneious software (version 8.1.7) and ORF finder tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Gene and protein comparisons were performed with programs BLASTn and BLASTp.

Reconstruction of phylogenetic trees

Reconstruction of phylogenetic trees was performed in MEGA6 with Maximum-likelihood method. The best selection model to generate the phylogenetic trees was selected with the programme Modeltest 3.7. Alignments were performed using MUSCLE software using default settings.

Histopathology

Tissue was fixed in 10% buffered formalin, trimmed, and processed routinely for histopathology. Tissue sections were cut at 3 μ m and stained with haematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome.¹

Ethics statement

This project was approved by Universidade Federal do Rio Grande do Sul Animal Ethics Committee (number 28460) and we had the owner's permission to access the animals for the purposes of this study. Lesions were collected by veterinarians to prepare autogenous vaccines. All efforts were made to minimize animal suffering.

Results and discussion

Illumina sequencing overview

The Illumina MiSeq run generated a total 504,352 high quality sequence reads. Sequence reads were *de novo* assembled using SPAdes 3.6 and the generated contigs were compared to the GenBank database using BLASTn and BLASTx. SPAdes 3.6 assembler generated a total of 16,341 contigs (≥ 200 nt). From these, 22 (0.13%) showed identities with PV sequences. The remaining contigs were either related to the bovine, bacterial genomes or to unknown sources. All PV assemblies were confirmed by mapping sequenced reads to contigs using Geneious version 8.1.7. Using this approach, a total of 1.354 reads (0.26%) were mapped to the PV contigs. Detailed results are shown in Table 1.

Phylogenetic tree of recovered BPV genomes

In this study, RCA followed by NGS approach was applied to analyze the extent of PVs types in a bovine papillomatous lesion. The method enabled the detection of four PV types, belonging to three genera. This technique could magnify the sensitivity of all PV present in this sample and allow the understanding of the animal history of infection by different PV types. From 22 PV-related contigs, two of them (BPV13 and the recently described BPV BR/14RO-17) were a full genome (Figure 2). Remaining contigs showed high degree of nucleotide and amino acid identities with the newly discovered BPV BR/14RO-18 (nine contigs, comprising approximately 85% of the genome) and BPV BR/14RO-20 (eleven contigs, comprising approximately 61% of the genome) (Figure 1).

Regarding BPV13 (*Deltapapillomavirus 4* species from *Deltapapillomavirus* genus), the recovered genome was 7,963 bp in length, arranged in a circular DNA molecule. This genome sequence showed the same characteristics as the reference

genome: six putative early ORFs (E6, E7, E1, E2, E4 and E5), two late ORFs encoding capsid proteins (L1 and L2) and a non-coding region between them (Batista et al. 2013). BPV13 strain '09RO11' shows 99.9% of identity with BPV13 strain BR14RO (GenBank accession no. KU519390, detected Amazon region, Brazil), 99.8% of identity with BPV13 JQ798171 (from Southern Brazil) e 99.7 % of identity with BPV13 strain Hainan KM258443 (China). As expected, most of the nucleotide differences were found in non-coding region.

The second complete genome recovered in this sample was nearly identical to genome BPV BR/14RO-17, recently described in Amazon region (Daudt et al. 2016). This *Xipapillomavirus* shows low degree of nucleotide identity with previously characterized congeners (BPV3, 4, 6, 9, 10, 11, 12 and 15) and shares 99.9% of identity with recently described BPV BR/14RO-17. The main genomic features is the presence of the E6 and E7 oncogenes, E1 and E2 ORFs and the two late regions coding the capsid proteins L1 and L2. This genome, as well as the recently described BPV BR/14RO-17 (Daudt et al. 2016) lacks the E4 ORF. Additionally, we detected contigs related to BPV BR/14RO-18 (putative new genus) and BPV BR/14RO-20 (a *Xipapillomavirus* species), which were also found in a previous study (Daudt et al., 2016). These contigs were mapped to the reference genomes (as shown in Figure 1). Contigs related to BPV BR/14RO-18 showed 99.9-100% of identity with the reference genome. BPV BR/14RO-20 related contigs shared 98.2 to 100% of identity with the reference genome. The majority of BPV types and putative new types have been characterized using degenerate primers (Batista et al. 2013). Such protocols have important limitations because they allow the discovery of only closely related PVs and select a virus population with higher affinity to the *primer* sequence; this could make

difficult the annealing of the other viruses present in the same sample. Thus, the randomly primed RCA followed by NGS offers the possibility to amplify and detect any circular DNA that is present in a sample without specificity, allowing a great overview of unknown PVs (Daudt et al. 2016).

A phylogenetic tree was reconstructed with optimized alignments based on the nucleotide sequence of **L1** gene using a set of BPV-representative sequences (Figure 2). BPV13 strain '09RO11' grouped in the **Deltapapillomavirus** branch with other BPV13 strains. BPV BR/14RO-17 strain '09RO11' and BPV BR/14RO-20 strain '09RO11' grouped in the *Xipapillomavirus* branch which also contains BPV3, 4, 6, 9, 10, 11 and 15. Three BPV species comprise the *Xipapillomavirus* genus, according to previous reports: *Xipapillomavirus 1* (comprised by BPV3, 4, 6, 9, 10, 11 and 15), *Xipapillomavirus 2* (BPV12) and *Xipapillomavirus 3* (*Rangifer tarandus* PV2, RtPV2). BPV BR/14RO-20 was most closely related to RtPV2 (*Rangifer tarandus* PV2) (74% sequence identity), and based on phylogenetic analysis, BPV BR/14RO-20 strain '09RO11' can be allocated within *Xipapillomavirus* genus, *Xipapillomavirus 2* species. Our work reinforces the data reported by Daudt et al. (2016) suggesting a new type within *Xipapillomavirus 2* species.

Putative BPV BR/14RO-17 was most closely related to BPV3 (approximately 62% of nt identity). Based in nucleotide sequence analysis and phylogenetic trees, BPV BR/14RO-17 strain '09RO11' can be allocated within *Xipapillomavirus* genus and probably is the second member of *Xipapillomavirus 3* species. Putative BPV BR/14RO-18 strain '09RO11' grouped in the same branch of BPV BR/14RO-18 (KU519393) and likely represents a new PV genus.

In the present study, we report the presence of four BPVs in a single papilloma lesion collected from a bovine. Similar works showed the occurrence of similar events in cattle (Melo et al. 2014; Claus et al. 2009; Carvalho et al. 2013; Batista et al. 2013; Daudt et al. 2016) but these reports are not yet comparable to the massive PV co-infection indications (Goldman et al. 2013; Poljak et al. 2010). More works are necessary to the understanding of the real dimension of co-infections in BPV lesions.

Histopathological findings

Neoplastic tissue of the sample analyzed consisted of exophytic papillomatous lesions, epithelium proliferation, and well-differentiated cells, showing marked acanthosis. This pattern has also been described in other BPV-associated lesions (Lunardi et al. 2013; Araldi et al. 2014; da Silva et al. 2015; Daudt et al. 2016). Based on the histopathological findings, the diagnosis of epidermal papillomatosis was confirmed for the specimen.

Conclusion

This study evaluated the diversity of BPV types co-infecting one sample of a bovine skin wart. Four different BPV types were detected by RCA followed by NGS, of which three are putative new types. These results suggest the existence of many other BPV types that may have been undetected with usual assays. BPV co-infection indicates that bovines can harbor genetically diverse PVs, similar to humans. However, more studies are necessary to provide further understanding of the diversity, biology and pathogenicity of BPVs.

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Acre (FAPAC). This work was partially supported by the FINEP proj. SANIMARS (no. 01.10.0783.04). CWC is CNPq productivity research fellow.

References

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

ARALDI, R. P. et al. Bovine papillomavirus in 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. Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. **Vet. J.** v.197, p. 368-373, 2013.

BORZACCHIELLO, G. Bovine Papillomavirus: New Insights into an Old Disease. **Transboundary Emerging Diseases**, v.1, p.1-10, 2014.

BURK, R.D., HARARI, A., CHEN, Z., Human Papillomavirus Genome Variants. **Virology** v. 445 n.1, p. 232–43, 2013.

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

CARVALHO, R. F. et al. Bovine Papillomavirus in Brazil: Detection of Coinfection of Unusual Types by a PCR-RFLP Method. **BioMed Research International**, 2013.

CLAUS, M. P. et al. Multiple bovine papillomavirus infections associated with cutaneous papillomatosis in Brazilian cattle herds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 93–98, 2009.

DAUDT C. How many papillomavirus species can go undetected in papilloma lesions? **Scientific Reports** 6. Article number: 36480, 2016.

DEZEN D. Multiply-Primed Rolling-Circle Amplification (MPRCA) of PCV2 Genomes: Applications on Detection, Sequencing and Virus Isolation. **Research in Veterinary Science**, v.88, n.3, p.436-40, 2010.

FORSLUND O., LY H., REID C., HIGGINS G. A broad spectrum of human papillomavirus types is present in the skin of Australian patients with non-melanoma skin cancers and solar keratosis. **Br J Dermatol** v. 149, p. 64–73, 2003.

GOLDMAN, B. Patterns of cervical coinfection with multiple human papilloma virus types in a screening population in Denmark. **Vaccine** v. 31, p. 1604–1609, 2013.

LUNARDI, M. et al. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. **Veterinary microbiology**, v. 162, n. 1, p. 207–13, 2013.

LONGWORTH M.S., LAIMINS L.A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiol Mol Biol Rev** v. 68, p. 362–372, 2004.

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

MEIRING, T.L. Next-Generation Sequencing of Cervical DNA Detects Human Papillomavirus Types Not Detected by Commercial Kits. **Virology Journal** v. 9, p.164, 2012.

MELO, T. C. Phylogenetic Classification and Clinical Aspects of a New Putative Deltapapillomavirus Associated with Skin Lesions in Cattle. **Genetics and Molecular Research** v. 13, n. 2, p. 2458-69, 2014.

POLJAK, M. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 10, p. 1139, 2010.

RECTOR A. Characterization of a novel close-to-root papillomavirus from a florida manatee by using multiply primed rolling-circle amplification: *trichechus manatus latirostris* papillomavirus type 1. **Virol sundberg**, v. 78, n.22, p. 12698-12702, 2004.

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

DA SILVA F.R.C. Novel Bovine Papillomavirus Type Discovered by Rolling-Circle

Amplification Coupled with Next-Generation Sequencing. **PLOS ONE** v.11, n.9, 2016.

SILVA, M.A.R. Comparison of Two PCR Strategies for the Detection of Bovine Papillomavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 192, n. 1-2, pg 55-8, 2013.

WOSIACKI, S. Papilomavírus Bovino Tipo 2 Na Etiologia Da Hematúria Enzoótica Bovina. **Semina: Ciências Agrárias**, v.23, n. 1, p. 121–30, 2002.

ZHU, W. et al. Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. **Archives of Virology**, v. 157, n. 1, p. 85–91, jan. 2012.

Table 1. Overall genome coverage of papillomavirus contig sequences recovered from a papillomatous lesion.

	GenBank acession no.	Read count*	Mean genome coverage[#]	No. of contigs
BPV13	xxx	275	3.8	1, circular
BPV BR/14RO-17	xxx	660	9.9	1, circular
BPV BR/14RO-18	xxx	235	3.5	9
BPV BR/14RO -20	xxx	184	2.8	11

*Number of reads mapped to the reference. [#]Average number of times each base was sequenced.

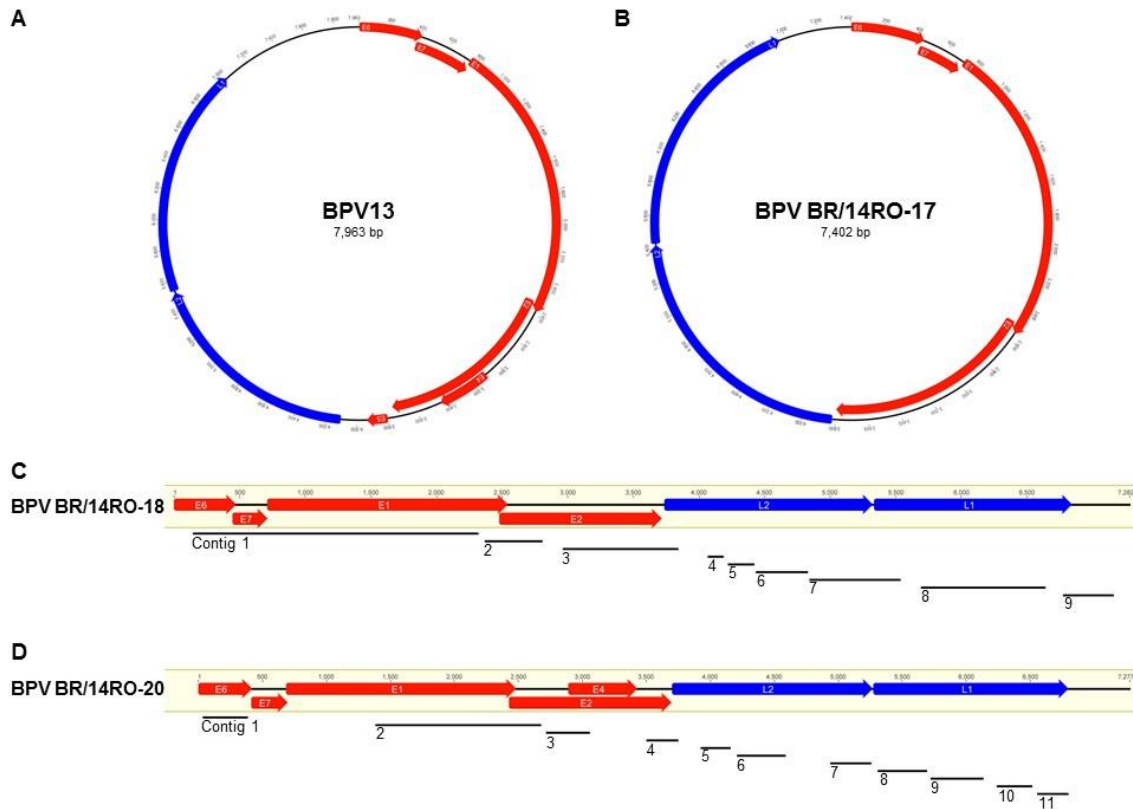


Figure 1. Genomic organization of PV genomes found in this study. The first nucleotide in the ORF6 was assigned a number 1 in the sequences. (A) Complete genome of BPV13. (B) Complete genome of BPV BR/14RO-17. (C) and (D) Contigs of BPV BR/14RO-18 and BPV BR/14RO-20 mapped to reference genomes.

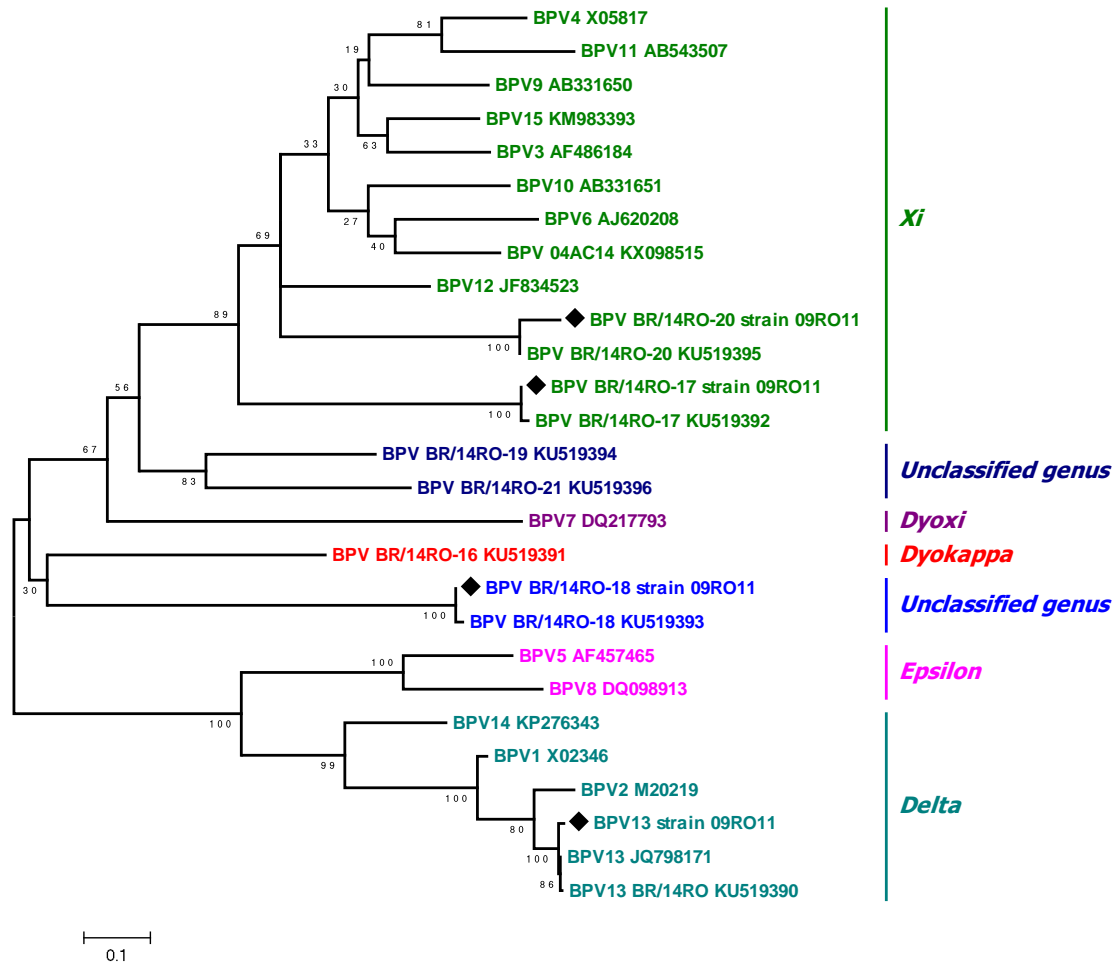


Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree of L1 gene sequences of bovine papillomaviruses. Nucleotide sequences of the L1 gene were compared to all bovine papillomaviruses sequences described so far.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A estratégia de amplificação por RCA seguida por NGS, permitiu a obtenção de sequências genômicas completas de BPVs ainda não descritos. Desta forma, sugere-se a existência de muitos outros tipos de BPVs que podem não ter sido detectados por técnicas convencionais.

- Em uma amostra de lesão epital bovina foram detectados 4 tipos de papilomavírus que, a partir da comparação das sequências de nucleotídeos no gene L1 com a de outros representantes desta família viral, foi determinada a classificação no gênero *Deltapapilomavirus* (BPV13), *Xipapilomavírus* (BPV17 e BPV20) e Novo gênero (BPV18).

- Este trabalho contribuiu com as novas descobertas de prováveis novos tipos de BPVs e, dessa forma, fortalece a hipótese que os bovinos podem abrigar tantos tipos de PVs quanto os humanos.

5 REFERÊNCIAS

AIELLO, S. E.; ASA, M. (EDS.). **Manual Merk de veterinária**. 8. ed. São Paulo - SP: ROCA LTDA, 2001.

ALFIERI, A. A.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. F. Papillomaviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária**. 2. ed. Santa Maria: UFSM p. 463–480, 2012.

AMTMANN E., MULLER H., SAUER G. Equine connective tissue tumours contain unintegrated bovine papilloma virus DNA. **J. Virol.** 35, 962–964, 1980.

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

ARALDI, R. P. et al. Bovine papillomavirus in beef cattle: First description of BPV-12 and putative type BAPV8 in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, 13 (3): 5644-5653, 2014.

BAXTER, M. K. et al. The Mitotic Chromosome Binding Activity of the Papillomavirus E2 Protein Correlates with Interaction with the Cellular The Mitotic Chromosome Binding Activity of the Papillomavirus E2 Protein Correlates with Interaction with the Cellular Chromosomal Prote. **Journal of Virology**, v. 79, n. 8, p. 4806–4818, 2005.

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

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.

BLOOD D. C.; RADOSTITS O. M.; GAY C. C. E., P. *Clínica Veterinária*. 7 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

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.

BOGAERT, L. et al. High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin

of equine sarcoid-affected and healthy horses. **Veterinary Microbiology**, v. 129, n. 1-2, p. 58–68, 2008.

BORZACCHIELLO, G. et al. Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the south of Italy. **Journal of Comparative Pathology**, v 128, 203-206, 2003.

BORZACCHIELLO, G. et al. Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor beta receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. **Oncogene**, v. 25, n. 8, p. 1251–60, 2006.

BORZACCHIELLO, G. et al. Bovine papillomavirus type-2 DNA and expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular tumours of the urinary bladder in cattle. **Cancer Letters**, v. 250, n. 1, p. 82–91, 2007.

BORZACCHIELLO, G. et al. Co-expression of Bovine Papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in Naturally occurring carcinomas of the urinary bladder in cattle. **Journal of Comparative Pathology**, v. 141, n. 1, p. 84–88, 2009.

BORZACCHIELLO, G.; ROPERTO, F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research**, v. 39, n. 5, p. 1–19, 2008.

BRAVO, I. G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses: viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evolution, Medicine, and Public Health**, v. 2015, n. 1, p. 32–51, 2015.

CAMPO, M. S. et al. Association of Bovine Papillomavirus Type 2 and Bracken Fern with Bladder Cancer in Cattle. 52(24):6898-904, 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. et al. Latent papillomavirus infection in cattle. **Research in Veterinary Science**, v. 56, n. 2, p. 151–157, 1994.

CAMPO, M. S. Bovine papillomavirus and cancer. **Veterinary Journal**, v. 154, n. 3, p. 175–188, 1997.

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

CAMPO, M. S. Papillomavirus and disease in humans and animals. **Veterinary and comparative oncology**, v. 1, n. 1, p. 3–14, 2003.

CAMPO, M. S. Bovine Papillomavirus: old system, new lessons. **Papillomavirus research - From natural history to vaccines and beyond**. UK: Caister Academic Press p. 373–387, 2006.

CARVALHO, C. C. R. et al. Detection of bovine papillomavirus types, co-infection and a putative new BPV11 subtype in cattle. **Transboundary and emerging diseases**, v. 59, n. 5, p. 441–7, 2012.

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

CLAUS, M. P. et al. Multiple bovine papillomavirus infections associated with cutaneous papillomatosis in Brazilian cattle herds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 93–98, 2009.

CORTEGGIO, A. et al. Expression of Gap Junction Protein Connexin 43 in Bovine Urinary Bladder Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 144, n. 1, p. 86–90, 2011.

CORTEGGIO, A. et al. Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one? **Infectious agents and cancer**, v. 8, n. 1, p. 1–21, 2013.

DASSIE, C. Papilomatose: prejuízos não estão só na aparência. **Revista Balde Branco**. São Paulo. 414:50-54 p. 1999.

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

DAUDT C. How many papillomavirus species can go undetected in papilloma lesions? **Scientific Reports** 6. Article number: 36480, 2016.

DE CARVALHO, C. et al. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, SUPPL. 1, p. 82–84, 2003.

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

DEL FAVA C., VERISSIMO C.J., RODRIGUES C.F.C., CUNHA E.A., UEDA M., MAIORKA P.C., D'ANGELINO J.L. Occurrence of squamous cell carcinoma in sheep from a farm in São Paulo state, Brazil. **Arq Inst Biol**; 68(1):35-40, 2001.

DINIZ N., MELO T.C., SANTOS J.F., MORI E., BRANDÃO P.E., RICHTZENHAIN L.J., FREITAS A.C., BEÇAK W., CARVALHO R.F., STOCCO R.C. Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil. **Genet Mol Res**, 8: 1474-1480, 2009.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55–70, 2012.

DOORBAR, J. Latent papillomavirus infections and their regulation. **Current opinion in virology**, v. 3, n. 4, p. 416–21, 2013.

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**; 3(1):36-8, 1991.

FINLAY, M. et al. The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. **Virus Research**, 2009.

FINLAY, M. Equine sarcoids and bovine papillomavirus; unraveling the viral pathogenesis. p. 18–232, 2011.

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. et al. Human papillomavirus vertical transmission: review of current data. **Clinical infectious diseases an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 56, n. 10, p. 1451–6, 2013.

HARRIS, S.; BOTCHAN, M. Crystal structure of the human papillomavirus type 18 E2 activation domain. **Science**, v. 284, n. 5420, p. 1673–1677, 1999.

HOWLEY, P.; LOWY, D. Papillomaviruses. **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: [s.n.]. p. 2197–2229, 2002.

ICTV. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/>>. Acesso em: 14 de janeiro. 2017.

JARRETT, W. F. H. et al. Studies on vaccination against papillomaviruses: Prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. **Virology**, v. 184, n. 1, p. 33–42, 1991.

JARRETT, W. F. H. et al. 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. 264, n. 1984, p. 255–264, 1994.

KANODIA S., FAHEY L.M. e KAST W.M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Curr Cancer Drug Targets** 7(1):79-89, 2007.

LAMBERT, P. F. MINIREVIEW Papillomavirus DNA Replication. **Journal of Virology**, v. 65, n. 7, p. 3417–3420, 1991.

LANCASTER W.D. Apparent lack of integration of bovine papillomavirus DNA in virus-induced equine and bovine tumor cells and virustransformed mouse cells. **Virology** 108, 251–255, 1981.

LAZARCZYK, M. et al. The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 73, n. 2, p. 348–70, 2009.

LEISHANGTHEM G.D., SOMVANSHI R., TIWARI A.K. Detection of bovine papilloma- viruses in cutaneous warts/ papillomas in cattle. **Indian J. Vet. Pathol.**, 32: 15-20, 2008.

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. J. et al. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 1, 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.

LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Review series Prophylactic human papillomavirus vaccines. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 1167–1173, 2006.

LUNARDI, M. et al. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. **Veterinary microbiology**, v. 162, n. 1, p. 207–13, 2013a.

LUNARDI, M. et al. Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. Epub ahead, n. 7, p. 2167–71, 2013b.

LUNARDI, M. et al. Genetic diversity of bovine papillomavirus types, including two putative new types, in teat warts from dairy cattle herds. **Archives of Virology**, p. 1–9, 2016.

MONTEIRO V.L.C., COELHO M.C.O.C., CARNEIRO A.S., Silva R.F.A.A., TEIXEIRA M.N., Wanderley AG, Wanderley EK, Franco ES. Descrição clínica e histopatológica da papilomatose cutânea bovina (BPV). **Ciência Animal Brasileira**;9(4):1079-88, 2008.

MÜLLER, L. **Development of a Cross-Protective L2-based Vaccine against Bovine Papillomavirus and Assessment of its Safety and Immunogenicity in Cattle** Lis Ribeiro Magalhães de Carvalho Müller. [s.l.] University of Heidelberg, 2014.

MUNDAY, J. S. et al. Feline cutaneous viral papilloma associated with human papillomavirus type 9. **Veterinary pathology**, v. 44, n. 2007, p. 924–927, 2007.

MUNDAY, J. S. Bovine and Human Papillomaviruses: A Comparative Review. **Veterinary pathology**, n. June, 2014.

MUNDAY, J. S. et al. Genomic characterisation of the feline sarcoid-associated papillomavirus and proposed classification as *Bos taurus* papillomavirus type 14. **Veterinary Microbiology**, v. 177, n. 3-4, p. 189–185, 2015.

MUNDAY, J. S.; KIUPEL, M. Papillomavirus-associated cutaneous neoplasia in mammals. **Veterinary pathology**, v. 47, n. December 2009, p. 254–264, 2010.

MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p. 213–228, 2002.

NASCIMENTO, G. a, SOUZA, E.V.M., CAMPOS-FERREIRA, D.S., ARRUDA, M.S., CASTELLETTI, C.H.M., WANDERLEY, M.S.O., EKERT, M.H.F., BRUNESKA, D., LIMA-FILHO, J.L., 2012. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. **Biosens. Bioelectron.** 38, 61–6. doi:10.1016/j.bios.04.052, 2014.

NASIR, L.; CAMPO, M. S. Bovine papillomaviruses: Their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. **Veterinary Dermatology**, 2008.

NICHOLLS, P. K.; STANLEY, M. A. The immunology of animal papillomaviruses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 101–127, 2000.

O'BRIEN, P. M.; SAVERIA CAMPO, M. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. **Virus Research**, v. 88, n. 1-2, p. 103–117, 2002.

OGAWA, T. et al. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. **The Journal of general virology**, v. 85, n. Pt 8, p. 2191–7, ago. 2004.

OLIVEIRA, V. M. Papilomatose ou verruga dos bovinos. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/sala/artigos/artigolinha.php?id=38>>. Acessado em Dezembro de 2016.

PANGTY K., SINGH S., GOSWAMI R., SAIKUMAR G., and SOMVANSHI R. Detection of BPV-1 and -2 and quantification of BPV-1 by real-time PCR in cutaneous warts in cattle and buffaloes. **Transbound Emerg Dis** 57, 185-196, 2010

PFISTER, H.; ZUR HAUSEN, H. Characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV) and antibody response to HPV 1. **Me. Microbiol. Immunol.**, v. 9, p. 13–19, 1978.

RECTOR, A.; VAN RANST, M. Animal papillomaviruses. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 213–23, out. 2013.

REID, S. et al. Epidemiological observations on sarcoids in a population of donkeys (*Equus asinus*). **The Veterinary Record**, v. 134, n. 9, p. 207–211, 1994.

ROPERTO, S. et al. Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: Possible biological role. **Journal of General**

Virology, v. 89, n. 12, p. 3027–3033, 2008.

ROPERTO, S. et al. A review of bovine urothelial tumours and tumour-like lesions of the urinary bladder. **Journal of Comparative Pathology**, v. 142, n. 2-3, p. 95–108, 2010.

SANDERS, C.; STENLUND, A. Mechanis and requirements for bovine papillomavirus type 1, E1 initiator complex assembly promoted by E2 trnscription factor bound to distal sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 26, p. 23689–23699, 2001.

SANTIN, A. D.; HERMONAT, P. L.; RAVAGGI, A.; BELLONE, S.; ROMAN, J. J.; JAYAPRABHU, S.; PECORELLI, S.; PARHAM, G. P.; CANNON, M. J. **Clinical Cancer Research**, v. 7, p. 804-810, 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

SCHILLER, J. T.; MÜLLER, M. Next generation prophylatic human papillomaviruses cavvines. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 5, p. e217–e225, 2015.

SCHUCH, L. F. D. Papilomatose bovina. In: RIET-CORREA, F. et al. (Eds.). . **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 2. ed. São Paulo - SP: VARELA EDITORA E LIVRARIA LTDA, 2001. p. 144–147.

SHAFTI-KERAMAT, S. et al. Bovine papillomavirus type 1 (BPV1) and BPV2 are closely related serotypes. **Virology**, v. 393, n. 1, p. 1–6, 2009.

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.

SMITH, B. **Medicina interna de grandes animais**. 3dr. ed. Barueri, SP: Manole, 2006.

STEWART N.; BACCHETTI, S. Expression of SV40 large T antigen, but not small t antigen, is required for the induction of chromosomal aberrations in transformed human cells. **Virology**, v. 180, p. 49-57, 1991.

TOMITA, Y. et al. Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. **Virus Genes**, v. 35, n. 2, p. 243–9, out. 2007.

TOZATO, C. C. et al. Teat papillomatosis associated with bovine papillomavirus types 6, 7, 9, and 10 in dairy cattle from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 905–909, 2013.

VENUTI, A. et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. **Molecular cancer**, v. 10, n. 1, p. 140 (2011).

WARD, P., COLEMAN, D. V., MALCOLM, A. D. Regulatory mechanisms of the papillomaviruses. **Trends Genet**, v. 5, n. 4, p. 97-9, 1989.

YAGUIU A., DAGLI M.L.Z., BIRGEL Jr E.H., ALVES REIS B.C.A.A., FERRAZ O.P., GOES L.G.B., PITUCO E.M., FREITAS A.C., BECAK W., STOCCO DOS SANTOS R.C. Simultaneous presence of bovine papillomavirus (BPV) and bovine leukemia virus (BLV) in different bovine tissues: in situ hybridization and cytogenetic analysis. **Gen. Mol. Res.**, 7: 487-497, 2008.

ZHENG, ZM, BAKER, C., 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post- transcriptional regulation. **Front. Biosci.** 11, 2286–2302, 2006.

ZHU, W. et al. Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. **Archives of Virology**, v. 157, n. 1, p. 85–91, jan. 2012.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and Cancer: From Basic Studies to Clinical Application. **Nature**, v. 2, p. 342–350, 2002.