



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**

---

**DANIEL VIVIAN**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPOS 1, 2 e 6 DE LESÕES CUTÂNEAS EM  
REBANHOS DO ESTADO DO PARANÁ**

---

**LONDRINA – PARANÁ**

**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DANIEL VIVIAN**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPOS 1, 2 e 6 DE LESÕES CUTÂNEAS EM  
REBANHOS DO ESTADO DO PARANÁ**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação (nível: Mestrado) em Ciência  
Animal da Universidade Estadual de Londrina  
para a obtenção de título de Mestre em  
Ciência Animal.**

**Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo  
Alfieri**

**LONDRINA – PARANÁ**

**2006**

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, sob orientação do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

**1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**

**2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**

**3. Fundação Araucária (FAP/PR)**

**4. PROPPG: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina**

Candidato:

**DANIEL VIVIAN**

Título da dissertação:

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPOS 1, 2 e 6 DE LESÕES CUTÂNEAS EM  
REBANHOS DO ESTADO DO PARANÁ**

Londrina, 25 de agosto de 2006.

Comissão Examinadora:

---

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

---

Prof. Dr. Júlio César de Freitas

---

Prof. Dr. Luiz César da Silva

***Agradecimentos***

---

---

---

## Agradeço

Aos meus pais pelo amor, incentivos e compreensão em todos os momentos

Ao meu irmão pelo incentivo e pelas “brincadeiras”.

Aos funcionários dos Departamentos de Medicina Veterinária Preventiva e Laboratório de Patologia Clínica, Professora Mara, José, Joãozinho, Elza, Inês.

Aos funcionários do Laboratório de Virologia Animal, Dalíria, Maria, pela paciência e amizade.

A Kerlei, pela amizade, carinho e conselhos desde os tempos de estagiário.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, orientador

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri, pela orientação, paciência e principalmente pela compreensão que teve durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Júlio César de Freitas, Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri e Dra.

Márcia de Aguiar Ferreira pela participação na banca de qualificação e ao Prof.

Dr. Júlio César de Freitas e Prof. Dr. Luiz César da Silva pela participação na banca de defesa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela transmissão de conhecimento.

A Marlise, “a irmã que não tive”, por tudo que fez por mim, não vou esquecer disso nunca!! Você tem um lugar especial no meu coração!!

Ao Luis Afonso Claus, pela grande ajuda durante o experimento, pela ótima companhia durante as viagens, pelos conselhos, e boas risadas.

A Raquel pela amizade, pelo carinho e companhia.

A Michele pela força nas análises filogenéticas e também pelas gargalhadas.

---

---

Aos meus amigos e amigas, de turma do mestrado que estiveram junto  
comigo em todas as horas.

Aos amigos dos demais laboratórios em especial da virologia que estiveram  
presentes em algum momento durante a realização do mestrado.

A Juliana Arena Galhardo, pela amizade que se tornou cada vez maior.

A Betinha, que sempre teve a sabedoria em usar as palavras certas nos  
momentos difíceis.

A Flora pelos conselhos e amizade, além das risadas.

A Vanessa, que se tornou uma grande amiga, pela companhia constante  
durante a fase de redação da dissertação e durante o nosso interminável  
treinamento profissional.

Ao Fábio Galli, Luciano Malanski “meus irmãos” que sempre estiveram juntos  
comigo nas horas tristes e felizes, “gosto muito de vocês”.

Ao monstro do laboratório, pelos erros que ocorreram.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente.

Todos vocês tem um lugar no meu coração, uns alojados nos átrios e outros  
nos ventrículos, mas todos no meu coração!!

VALEU!!!!

# IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPOS 1, 2 e 6 DE LESÕES CUTÂNEAS EM REBANHOS DO ESTADO DO PARANÁ

## RESUMO

Os papilomavírus (PVs) pertencem a um grupo heterogêneo de vírus DNA epiteliotrópicos, que infectam as células basais induzindo-as à formação de lesões neoplásicas, conhecidas como papilomas ou verrugas, nos epitélios cutâneo e mucoso. A família *Papillomaviridae* é constituída por 16 gêneros e mais de uma centena de tipos virais. Até o momento foram caracterizados apenas seis tipos de papilomavírus bovino (BPV-1 a BPV-6), que estão incluídos nos gêneros *Delta-papillomavirus* (BPV-1 e 2), *Epsilon-papillomavirus* (BPV-5) e *Xi-papillomavirus* (BPV-3, 4 e 6). Considerando o tropismo celular e as lesões ocasionadas, os seis tipos de BPV podem ser classificados em dois subgrupos. O subgrupo A (BPV-1, 2 e 5) compreende os fibropapilomavírus e o subgrupo B (BPV-3, 4 e 6) os papilomavírus epiteliotrópicos. A ORF L1 é o gene mais conservado no genoma do papilomavírus e tem sido utilizada para a identificação dos tipos de BPV mais freqüentes em uma região e também de novos tipos virais. Os *primers* genéricos FAP59 e FAP64 foram utilizados para a amplificação de um fragmento com 478 pb do gene L1 do papilomavirus em nove amostras de papilomas cutâneos obtidos de seis animais provenientes de quatro rebanhos bovinos da região norte do Estado do Paraná. Em todas as amostras foi possível a amplificação de um produto de tamanho molecular esperado. Por meio da análise filogenética das seqüências foi possível identificar o BPV-2 em três amostras, o BPV-1 em uma e o BPV-6 em cinco amostras. O BPV-6 foi encontrado, tanto em papilomas cutâneos presentes no teto, quanto em outras partes do corpo. Em um dos animais, onde foram colhidas mais de uma amostra, foi encontrada infecção mista com o BPV-1 e BPV-2. As cinco amostras positivas para o BPV-6 apresentaram 100% de similaridade na matriz de identidade com a amostra padrão, porém foram identificadas divergências entre as amostras do BPV-2 e BPV-1 e aquelas depositadas em bases públicas de dados. As amostras do BPV-2, quando comparadas entre si, mostraram-se diferentes demonstrando o envolvimento de duas variantes virais.

**Palavras-chave:** bovino, papilomatose cutânea, papilomavírus bovino, PCR

# IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BOVINE PAPILLOMAVIRUS TYPES 1, 2 AND 6 IN SKIN WARTS IN CATTLE HERDS OF NORTH OF PARANA STATE

## ABSTRACT

The papillomavirus (PVs) belong to a heterogeneous group of epitheliotropic double-stranded DNA virus, that infect the basal cells inducing the neoplastic lesions formation, known as papillomas or warts, in the cutaneous and mucous epithelia. The family *Papillomaviridae* is constituted by 16 genus and more than a hundred of virus types. Until the moment only six types of bovine papilomavirus were characterized (BPV-1, BPV-6), that are included in the genus *Delta-papillomavirus* (BPV-1 and 2), *Epsilon-papillomavirus* (BPV-5) and *Xi-papillomavirus* (BPV-3, 4 and 6). Considering the cellular tropism and the caused lesions, the six types of BPV can be classified in two subgrupos. The subgrupo A (BPV-1, 2 and 5) understands the fibropapillomavirus and the subgrupo B (BPV-3, 4 and 6) the epitheliotropic papillomavirus. The ORF L1 gene is the most conserved in the genoma of the papillomavirus and has been used for the identification of the types of most frequent BPV in an region and also of new virus types. The generic primers FAP59 and FAP64 were used for the amplification of a fragment with 478 bp of the L1 gene of papillomavirus in nine cutaneous papilomas samples obtained of six animals from four cattle herds of the north of Paraná State. In all samples was possible the amplification of an expected molecular size product. Through the filogenetic analysis of the sequences was possible to identify BPV-2 in three samples, BPV-1 in one and BPV-6 in five samples. BPV-6 was found, present in cutaneous papillomas on the teat, as in other parts of the body. In one of the animals, were collected more than one sample, was found mixed infection with BPV-1 and BPV-2. The five positive samples for BPV-6 presented 100% of similarity in the identity matrix with the pattern sample, however were identified divergences between the samples of BPV-2 and BPV-1 and those deposited in public data bases. The samples of BPV-2, when compared to each other, showed different demonstrating the involvement of two viral variants.

**Key- Words:** bovine, cutaneous papillomatosis, bovine papillomavirus, PCR

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>BPV</b>	Papilomavírus bovino
<b>BPV-1</b>	Papilomavírus bovino tipo 1
<b>BPV-2</b>	Papilomavírus bovino tipo 2
<b>BPV-3</b>	Papilomavírus bovino tipo 3
<b>BPV-4</b>	Papilomavírus bovino tipo 4
<b>BPV-5</b>	Papilomavírus bovino tipo 5
<b>BPV-6</b>	Papilomavírus bovino tipo 6
<b>COPV</b>	<i>Canine oral papillomavirus</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxinucléico
<b>DEPEC</b>	dietilpirocarbonato
<b>HPV</b>	Papilomavírus humano
<b>LCR</b>	<i>Long control region</i>
<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salina
<b>PCR</b>	Reação em cadeia pela polimerase
<b>pmol</b>	Pico mol
<b>p/v</b>	Peso por volume
<b>q.s.p</b>	Quantidade suficiente para
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>TRIS</b>	hidroximetil amino metano
<b>U</b>	Unidades

## LISTA DE FIGURAS

### IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPOS 1, 2 e 6 DE LESÕES CUTÂNEAS EM REBANHOS DO ESTADO DO PARANÁ

**FIGURA 1** Eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídeo, dos produtos do gene L1 do papilomavírus bovino (BPV) amplificados pela PCR com *primers* genéricos FAP59 e FAP64, a partir de papilomas cutâneos em bovinos.

**FIGURA 2** Árvore filogenética original, construída pelo método de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*) com suporte de *bootstrap* para 1000 réplicas, a partir de um produto do gene L1 de papilomavírus amplificado pela PCR com *primers* genéricos (FAP59 e FAP64), incluindo nove amostras de papilomavírus bovino (LVA) identificadas no Estado do Paraná e estirpes padrão de papilomavírus bovino (BPV-1 a 6); humano (HPV-16 e 19) e canino (COPV) .

## LISTA DE QUADROS

### PAPILOMAVÍRUS BOVINO: ASPECTOS MOLECULARES E CLÍNICOS

**QUADRO 1** Função das proteínas dos papilomavírus

#### IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPOS 1, 2 e 6 DE LESÕES CUTÂNEAS EM REBANHOS DO ESTADO DO PARANÁ

**QUADRO 1** Distribuição dos tipos de papilomavírus bovino, identificados pela PCR e seqüenciamento, de acordo com a origem e algumas características das amostras de papiloma cutâneo analisadas.

**QUADRO 2** Matriz de identidade entre as seqüências de nucleotídeos de um fragmento do gene L1 do papilomavírus bovino, amplificado pela PCR com *primers* genéricos (FAP59 e FAP64) a partir de lesões cutâneas em bovinos, e as seqüências dos papilomavírus bovino tipos 1 a 6 disponíveis no GenBank.

**QUADRO 3** Matriz de identidade entre as seqüências de nucleotídeos de um fragmento do gene L1 do papilomavírus bovino, amplificado pela PCR com *primers* genéricos (FAP59 e FAP64) a partir de lesões cutâneas em bovinos.

# SUMÁRIO

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### PAPILOMAVÍRUS BOVINO: ASPECTOS MOLECULARES E CLÍNICOS

Introdução .....	1
Características e propriedades gerais.....	1
Estrutura e organização genômica.....	2
Classificação.....	6
Identificação de novos tipos virais.....	7
Critérios de classificação.....	7
Comparação dos tipos de PV.....	8
Enfermidades associadas.....	8
Patogenia e replicação.....	12
Diagnóstico .....	14
Vacinas.....	16
Perspectivas e considerações finais.....	16
Referências.....	17

## 2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral .....	24
2.2 Objetivos Específicos .....	24

## 3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

### IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPOS 1, 2 e 6 DE LESÕES CUTÂNEAS EM REBANHOS DO ESTADO DO PARANÁ

Resumo .....	26
Abstract .....	27
Introdução .....	28
Material e Métodos .....	30
Resultados .....	33
Discussão .....	39
Referências.....	42

4. CONCLUSÕES.....	47
--------------------	----

## 5. APÊNDICES

Apêndice A – Lista de Reagentes .....	49
Apêndice B – Soluções e Tampões .....	50
Apêndice C – Protocolos de Técnicas .....	53
Apêndice D – Comunicação em Congressos.....	56
Apêndice E – Filograma e matriz de identidade.....	57

## ***Revisão de literatura***

---

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)