



Uso da reação em cadeia da polimerase na detecção da papilomatose bovina no Estado de Pernambuco⁽¹⁾

(Use of polymerase chain reaction for detecting bovine papillomatosis in Pernambuco State)

"Artigo Científico/Scientific Article"

VLC Monteiro^{A(*)}, MA Silva^B, CCR Carvalho^B, AC Freitas^B,
ALT Cunha^A, MCOC Coelho^A, EK Wanderley^A

^ASetor de Cirurgia Experimental da Área de Clínica do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171 900 Recife-PE/Brasil.

^BDepartamento de Genética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901 Recife-PE/Brasil.

Resumo

A papilomatose bovina é uma enfermidade complexa que representa entrave produtivo e econômico à pecuária mundial. O papilomavírus bovino tipo 2 (BPV-2) é um DNA vírus epiteliotrópico que, possivelmente, está associado a lesões benignas de pele e malignas de bexiga. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de identificar a presença do BPV 2 em amostras de verrugas cutâneas de bovinos através da Reação em Cadeia pela Polimerase. Utilizando-se os "primers" específicos para BPV-2 obteve-se uma positividade em 32 das 40 amostras avaliadas (80%). De acordo com os resultados supracitados, pode-se concluir que a presença da BPV no Estado de Pernambuco está em concordância com os achados mundiais, destacando-se a importância da genotipagem no controle da infecção e, conseqüentemente, na adoção de medida específica.

Palavras-chave: bovino, virose, diagnóstico, DNA.

Abstract

The bovine papillomatosis is a complex disease that represents great productive and economical impediment to the world livestock. The BPV-2 is an epitheliotropic DNA virus that, possibly, is associated to benign lesions on skin and malignant on bladder. This work aimed to identify the presence of BPV-2 in samples of bovine cutaneous warts, using the Polymerase Chain Reaction. Using the specific primers for BPV-2 it was obtained an assertiveness of 32 in 40 analyzed samples (80%). According to the above mentioned results, it can be concluded that the prevalence of BPV in the State of Pernambuco is in agreement with the world discoveries, standing out the importance of the genotypage in the control of the infection, and, consequently, adoption of an specific therapy.

Key-words: bovine, viruses, diagnostic, DNA.

Introdução

O papilomavírus (PV) é um grupo de vírus de DNA dupla fita circular que apresenta um capsídeo externo formado por proteínas virais arranjadas de forma icosaédrica e que

infecta o epitélio escamoso da pele e mucosas. Causam infecções assintomáticas e também podem determinar lesões benignas ou malignas em várias espécies de mamíferos (CAMPO, 2006).

⁽¹⁾Trabalho extraído da Tese de Doutorado da primeira autora apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

^(*)Autora para correspondência/Corresponding author (vandamonteiro@yahoo.com).

^(S)Recebido em 11/06/07 e aceito em 12/02/08.

De acordo com a estrutura e composição do DNA são conhecidos seis diferentes tipos de papilomavírus bovino (BPV), os quais são classificados em dois subgrupos. O subgrupo A, contendo os BPVs 1, 2 e 5, formado pelos fibropapilomavírus e o subgrupo, B, contendo os BPVs 3, 4 e 6, que compreende os papilomavírus epiteliotrópicos (CAMPO, 2002).

Os BPV 1 e 2 causam fibropapilomas cutâneos, podendo determinar câncer de bexiga, o BPV 4 provoca papilomatose e câncer do trato gastrointestinal superior e os BPVs 5 e 6 ocasionam papilomatose das tetas e úbere (WOSIACKI et al., 2006; OGAWA, et al., 2007). Apesar dos PVs serem vírus epiteliotrópicos por infectarem queratinócitos e fibroblastos, os BPVs também podem ser encontrados em outros tecidos ou fluídos corporais. Em bovinos foi detectada a presença de BPV em sangue periférico (STOCCO et al., 1998), no trato reprodutivo e em gametas de fêmeas, bem como em amostras de sêmen (CARVALHO et al., 2003).

Os vírus da família papillomaviridae apresentam dificuldades para serem cultivados em sistema de cultura celular e a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresenta-se adequada para a detecção do papilomavírus devido à alta sensibilidade e especificidade e por não requerer o cultivo do vírus (WOSIACKI et al., 2006).

O segmento L1 do genoma do papilomavírus tem sido usado para detectar papilomavírus (KARLSEN et al., 1996; QU et al., 1997; De VILLIERS et al., 2004), visto que as células da camada dérmica de uma lesão papilomatosa proliferam excessivamente e nelas é possível encontrar inúmeras cópias do DNA viral (CARVALHO et al., 2003).

Os pares de “primers” FAP59/FAP64 e MY09/MY11 foram desenhados para parrear em uma região conservada do gene L1 de muitos tipos de HPV e, com o emprego desses “primers”, tem sido demonstrada a amplificação do DNA do papilomavírus de muitas espécies de animais, incluindo bovinos (CHAN et al.,

1995; QU et al., 1997; FORSLUND et al., 1999; OGAWA, 2004; MANOS et al., 2004;).

O vírus da papilomatose bovina causa vários danos à pele do animal com, conseqüente diminuição da qualidade e sua desvalorização desencadeia perdas econômicas expressivas para o produtor e a indústria de couros. Partindo do pressuposto e da ausência de trabalhos científicos e de informações consistentes a respeito da presença do vírus da papilomatose bovina no Estado de Pernambuco, teve-se o objetivo de identificar a presença do BPV-2 em amostras de verrugas cutâneas, utilizando a PCR.

Material e Métodos

O experimento foi desenvolvido numa propriedade de beneficiamento e fornecedora de leite tipo B, localizada no Município de Ribeirão - PE e no Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco.

Foram utilizadas 40 amostras de diferentes tipos de papilomas cutâneos (pedunculado, plano e misto), de fêmeas mestiças da raça Girolando com pelagem preta e branca e idade variável.

Os papilomas foram coletados de diversos locais do corpo dos animais, seguindo um protocolo de desinfecção e anti-sepsia. Inicialmente foi efetuada a limpeza local com água e sabão e anti-sepsia da área ao redor das verrugas com álcool a 70° C. Em seguida realizou-se a incisão dos papilomas com tesoura de Mayo® e lâmina de bisturi, utilizando-se para tal, luvas descartáveis para cada animal. As amostras foram acondicionadas em papel alumínio e imersas em nitrogênio líquido. Após o congelamento foram transportadas sob gelo para o laboratório e mantidas em refrigeração a 4° C até o momento do processamento. Cerca de 30 mg de material das verrugas selecionadas foram individualmente macerados para extração do DNA total com o auxílio do kit para extração de DNA total da Ambresco, sendo realizada de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

Cerca de 100 ng de DNA foi utilizado

para a análise por PCR. A qualidade do DNA foi controlada por amplificação com os “primers” para detecção do gene β -globina bovina (fw 5' – AAC CTC TTT GTT CAC AAC CAG – 3'; rev 5' – CAG ATG CTT AAC CCA CTG AGG – 3') que amplifica um fragmento de 450 pb, como controle da qualidade do DNA extraído, além dos controles negativos e positivos. A reação foi realizada com adaptações do protocolo de Stocco et al. (1998). O ciclo da PCR consistiu de uma desnaturação inicial por 3 minutos a 95° C, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 40 segundos, anelamento por 40 segundos a 58° C e extensão por 60 segundos a 72° C. A reação de amplificação ocorreu em volume final de 25 μ L contendo 1X o tampão da enzima, 1,5mM MgCl₂, 200 μ M dNTP mix, 1 μ L de cada “primer” e 0,625U/ μ L de “Taq” DNA polimerase (Cenbiot Enzimas, Centro de Biotecnologia da UFRGS-Porto Alegre/Brasil).

A detecção de papilomavírus foi realizada a partir de adaptações do protocolo de Ogawa et al. (2007) usando dois diferentes pares de “primers” Consenso, sendo FAP59 (Fw 5'-TAA CWG TIG GIC AYC CWT ATT-3'), FAP64 (Rev 5'-CCW ATA TCW VHC CAT ITC ICC ATC-3'), MY11 (Fw 5'- GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG-3') e MY09 (Rev 5'- CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC-3'). A reação de amplificação ocorreu em um volume de 25 μ L contendo 1X o tampão da enzima, 2,5mM MgCl₂, 200 μ M dNTP mix (Invitrogen™ Life Technologies/USA), 0,25 μ M de cada *primer* e 0,625U/ μ L de “Taq” DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies/USA). Para o par de “primer” FAP59/64, após uma desnaturação inicial a 94° C por 10 min, a PCR consistiu de 45 ciclos de 1,5 minutos a 94° C, 1,5 minutos a 50° C e 1,5 minutos a 72° C, seguido por uma extensão final a 72° C por 5 minutos. Para o par de “primer” MY09/11, inicialmente promoveu-se desnaturação a 95° C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 58° C e 60 segundos a 72° C e uma extensão final a 72° C por 5 minutos. O processo de amplificação foi realizado com um termociclador modelo PTC

200 (MJ Research Copany. Water Town, Massachusetts/USA).

Para a tipificação do papilomavírus utilizou-se “primers” específicos para BPV-2 (Fw 5' - GTT ATA CCA CCC AAA GAA GAC CCT - 3' e Rev 5' -CTG GTT GCA ACA GCT CTC TTT CTC - 3'), com seqüências complementares à região codificadora L1 (STOCCO et al., 1998). As condições da PCR são as mesmas descritas acima para a amplificação com os “primers” para β -globina.

Os produtos de amplificação (10 μ L) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta, onde foram fotografados.

Resultados e Discussão

Embora a infecção pelo BPV possa ser detectada por outras técnicas convencionais, optou-se pela técnica da PCR por ser mais rápida e de alta sensibilidade e especificidade na obtenção dos resultados como reportado por Wosiacki et al. (2006).

A análise molecular identificou bandas com “primers” genéricos (FAP e MY) e/ou específico (BPV-2) em 33 amostras (82,5%), indicando a presença do vírus na propriedade. Os resultados reforçaram os relatos de Carvalho et al. (2003) e Olson (1990) que detectaram a presença do vírus em vários países, reforçando a idéia de que esta infecção existe no Brasil e está presente em importantes regiões criatórias, como Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e, atualmente, em Pernambuco (Tabela 1).

A qualidade do DNA extraído das amostras de verrugas cutâneas dos animais foi controlada pela amplificação de um fragmento do gene β -globina bovina. O fragmento de 450 pares de base foi amplificado em 22 das 40 amostras avaliadas (55%). A presença de papilomavirus foi avaliada por PCR com os “primers” FAP59/94 e MY09/11 apenas nas amostras onde houve a amplificação com na β -globina. Houve amplificação em 12 das 22

(54,5%) amostras avaliadas para os “primers” MY09/11, mostrando assim, uma maior FAP59/64 e em apenas 1 das 22 (4,5%) com o sensibilidade do FAP59/64.

Tabela 1 - Positividade para BPV em verrugas cutâneas de bovinos detectadas pela PCR, utilizando os “primers” genéricos FAP e MY e o específico BPV2.

Amostras	“Primers”			
	β-GLOBINA	FAP	MY	BPV2
1	-	ND	ND	+
2	+	+	-	+
3	+	+	-	+
4	+	+	-	+
5	+	-	-	+
6	-	ND	ND	+
7	+	-	-	+
8	+	+	-	+
9	+	+	-	+
10	-	ND	ND	+
11	-	ND	ND	+
12	+	-	-	+
13	+	-	-	+
14	+	+	-	+
15	+	-	-	-
16	+	+	-	+
17	+	+	+	+
18	+	-	-	+
19	+	-	-	+
20	+	+	-	+
21	-	ND	ND	+
22	+	+	-	-
23	-	-	-	+
24	+	+	-	+
25	-	ND	ND	+
26	-	ND	ND	+
27	-	ND	ND	+
28	-	ND	ND	+
29	+	-	-	-
30	-	ND	ND	+
31	-	ND	ND	-
32	-	ND	ND	-
33	-	ND	ND	-
34	-	ND	ND	-
35	-	ND	ND	-
36	+	-	-	+
37	-	ND	ND	+
38	+	-	-	+
39	-	-	-	+
40	+	+	-	+

(ND) Não determinado; (+) presença; (-) ausência.

Utilizando-se os “primers” específicos para BPV-2 obteve-se uma positividade em 32 das 40 amostras avaliadas (80%), não sendo possível, nas amostras restantes, a diferenciação nos demais tipos virais.

Considerando-se apenas as amostras que amplificaram com os “primers” para β-globina, houve a amplificação em 19 das 22 (86%) amostras avaliadas, como mostra a Figura 1.

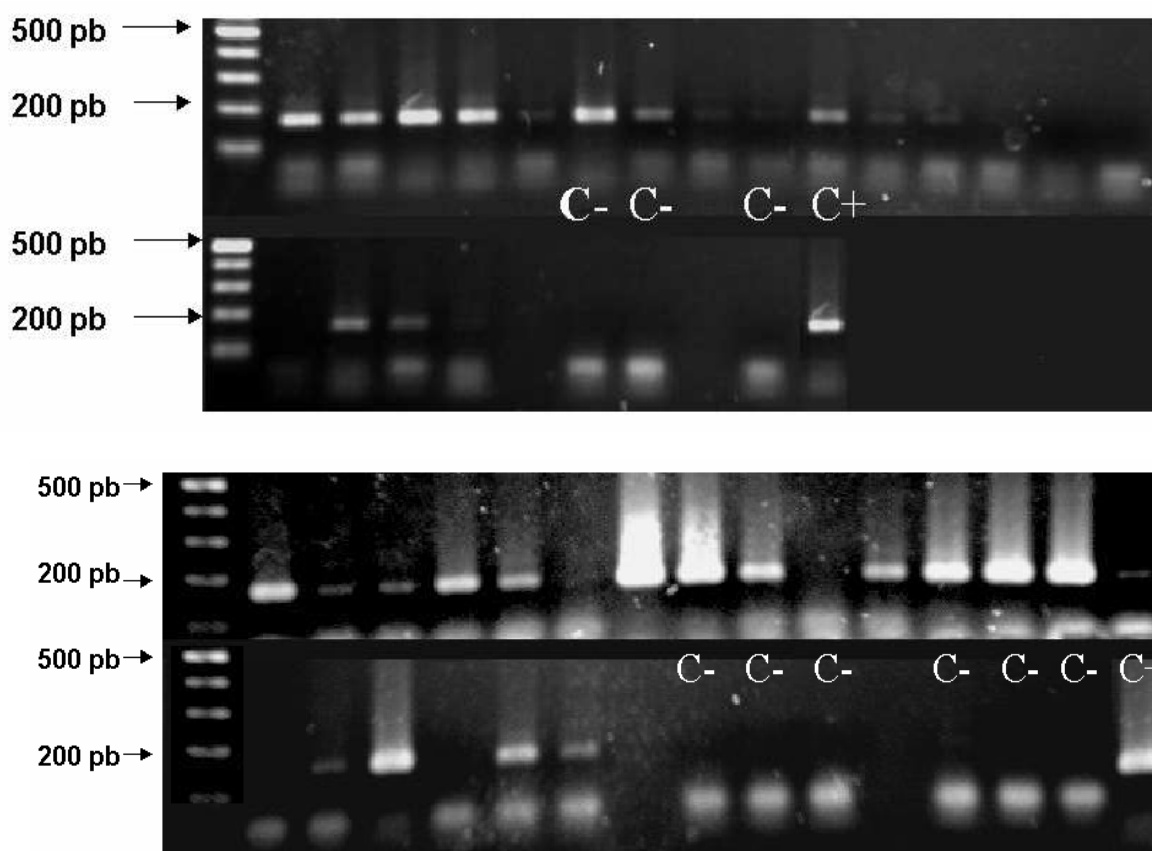


Figura 1 - PCR com “primer” BPV-2 para tipificação de DNA viral extraído de verrugas cutâneas. Na imagem estão representadas diferentes amostras de DNA seguidas por controles negativos e positivos, respectivamente. Como esperado para BPV 2, o fragmento amplificado contém 172 pb.

Apesar dos conjuntos de “primers” FAP59/64 e MY09/11 serem largamente utilizados em estudos epidemiológicos para detectar o vírus da papilomatose humana a vírus (HPV) devido a sua alta sensibilidade (CHAN et al., 1995; FORSLUND et al., 1999; MANOS et al., 2004; De VILLERS et al., 2004), os “primers” supracitados mostraram-se pouco eficientes na detecção do BPV, não sendo possível identificar as bandas equivalentes aos fragmentos esperados para os tipos virais. Esse achado contradiz as observações de Ogawa et al. (2007), quando relatam que estes “primers” detectam 100% de BPV nas amostras de verrugas cutâneas de bovino.

Por outro lado, não se pode categorizar como negativas estas amostras, salvo que existe relato de Rocha et al. (1998)

afirmando haver relação entre a carga viral, o momento da coleta e a eficiência da técnica como método de diagnóstico, visto que, se a amostra coletada apresentar baixa carga viral, a PCR pode não detectar a presença do vírus, corroborando com os resultados verificados neste experimento.

Porém, a análise molecular do DNA extraído das verrugas com “primers” genéricos para ampliação de qualquer tipo de papiloma é justificada pela necessidade de aumentar a capacidade de detecção do genoma viral por PCR, uma vez que a inserção do DNA viral no genoma da célula provoca perda parcial de seqüências dos genes da papilomatose, com perdas das regiões de pareamento dos “primers” genéricos (KARLSEN et al., 1996; QU et al., 1997; GRAVITT et al., 2000; KADO et al., 2001; SILVA et al., 2003).

Trabalhos utilizando esses mesmos “primers” para detectar o BPV são menos frequentes, contudo, a sua utilização tem sido demonstrada (OGAWA et al., 2007).

Diferentes fatores influenciam na sensibilidade da PCR, como o método utilizado na extração do DNA, o tamanho do fragmento amplificado, a qualidade do tecido de onde ocorreu a extração, a quantidade e a qualidade de DNA utilizado, bem como as condições da PCR (GEBARA, 2004). Assim sendo, a diferença de sensibilidade entre os “primers” de detecção geral (FAP59/64, MY09/11), β -globina bovina e BPV-2 pode ser explicada pelo tamanho do fragmento amplificado nessas amostras, que apresentavam DNA, possivelmente, degradado, mas que foi possível a amplificação de um fragmento pequeno de L1 a partir dos “primers” específicos para BPV-2, mesmo em amostras β -globina negativas.

Ooptou-se por usar o “primer” específico para o tipo 2 porque a infecção pelo BPV-2 é precursora do desenvolvimento de outras doenças, como observado em amostras de bexiga urinária de bovinos com hematúria enzoótica crônica, em bexiga apresentando ou não lesões neoplásicas, no trato reprodutivo e gametas de vacas e em sangue periférico de bovinos, podendo produzir abortos e infecções ocultas, sendo importante a sua investigação (STOCCO et al., 1998; CAMPO, 2002; BORZACHIELLO et al., 2003; WOSIACKI et al., 2006; OGAWA et al., 2007).

Os resultados permitem concluir que a presença da papilomatose bovina no Estado de Pernambuco está em concordância com os achados nos outros continentes, destacando-se a importância da genotipagem no controle da infecção, com conseqüente adoção de medidas específicas.

Referências

BORZACHIELLO, G. et al. Presence of bovine papillomavirus type 2 dna and expression of the viral oncoprotein e5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. **Journal of General Virology**, v.84, p.2921–2926, 2003.

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

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

CARVALHO, C. et al. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. **Brazilian Journal Microbiology**, v.34, p.82-88, 2003.

CHAN, S. Y. et al. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing phylogeny, and taxonomy. **Journal Virology**, v.69, p.3074-3083, 1995.

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

FORSLUND, O. et al. A broad range of human papillomaviruses types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. **Journal General Virology**, v.80, p.2437-2443, 1999.

GEBARA, E.T. Optimizing DNA amplification protocols. *Genoma analysis: a practical approach*. **Diagnostic Molecular Microbiology**, v.24, p.141-152, 2004.

GRAVITT, E. P. et al. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. **Journal Clinical Microbiology**, v.38, p.357-361, 2000.

KADO, S. et al. Detection of human papillomaviruses in cervical neoplasias using multiple sets of generic polymerase chain reaction primers. **Gynecologic Oncology**, v.81, p.47-52, 2001.

KARLSEN, F. et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. **Journal Clinical Microbiology**, v.34, n.9, p.2095-2100, 1996.

MANOS, M.M. et al. The use of polimerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cell**, v.7, p.209-214, 2004.

OGAWA, T. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. **Journal General Virology**, v.85, p.2191-2197, 2004.

OGAWA, T. et al. Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type. **Journal General Virology**, v. 88, p.1934-1938, 2007.

OLSON, C. Papillomaviruses. **Revista de Microbiologia**, v.46, n.2, p.191-207, 1990.

QU, W. et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP05+/GP06+ primers systems. **Journal Clinical Microbiology**, v.35, n.6, p.1304-1310, 1997.

ROCHA, M.A. et al. High sensitivity-nested PCR assay for HPV-1 detection in semen of naturally infected bulls. **Veterinary Microbiology**, v.63,

p.1-11, 1998.

SILVA, A.M.T.C. et al. Genotipagem de Papiloma Vírus Humano em pacientes com papilomatose laríngea recorrente. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.49, n.3, p.167- 174, 2003.

STOCCO S.R.C. et al. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. **Journal General Virology**, v.79, p.2127-2135, 1998.

WOSIACKI, S.R. et al. Bovine papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.6, p.635-638, 2006.