

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

ELIAS TIBÚRCIO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DA INFECÇÃO NATURAL PELO *Papilomavírus*
bovino tipo 2 NO DESENVOLVIMENTO DA HEMATÚRIA ENZOÓTICA DO GADO**

Recife
2017

ELIAS TIBÚRCIO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DA INFECÇÃO NATURAL PELO *Papilomavírus*
bovino tipo 2 NO DESENVOLVIMENTO DA HEMATÚRIA ENZOÓTICA DO GADO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Recife

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Tibúrcio Júnior, Elias

Avaliação da importância da infecção natural pelo *Papilomavírus* bovino tipo 2 no desenvolvimento da hematúria enzoótica do gado/ Elias Tibúrcio Júnior- 2018.

56 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Antônio Carlos de Freitas

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndice

1. Papilomavírus 2. Hematúria 3. Epidemiologia I. Freitas, Antônio Carlos de (orient.) II. Título

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-089

ELIAS TIBÚRCIO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DA INFECÇÃO NATURAL PELO
PAPILOMAVIRUS BOVINO TIPO 2 NO DESENVOLVIMENTO DA HEMATÚRIA
ENZOÓTICA DO GADO.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pernambuco
para obtenção do título de Mestre em
Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 29/06/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas / Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Angélica Ramos da Silva / Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia da Paraíba

Profa. Dra. Rita de Cássia Pereira de Lima / Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Elyda Gonçalves de Lima/ Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta dissertação às duas
pessoas mais importantes em minha
vida: Meu pai, Elias Tibúrcio e minha
mãe, Maria Lúcia. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por ter me sustentado até aqui, por ter me dado forças, coragem, inteligência e saúde para alcançar os meus objetivos.

A meu pai **Elias** e minha mãe **Lúcia**, é graças a vocês que estou aqui, sempre me apoiaram e me proporcionaram a oportunidade que vocês mesmos nunca tiveram. Vocês são a razão de querer ser alguém melhor, meus maiores exemplos de seres humanos que levarei comigo por toda a vida, vocês foram e sempre serão a minha inspiração.

A minha irmã **Elisabete** e meu irmão **Eliseu**. A meu tio **Isaque Nunes** e sua esposa **Edvânia**, minha tia **Lindineide Nunes**, minha segunda mãe, sou muito grato por tudo que fez por mim. As minhas queridas avós **Severina de Oliveira e Edite Nunes** in memoriam.

A todos meus professores da pós-graduação em Inovação Terapêutica, pelos ensinamentos e conselhos ao longo destes dois anos de mestrado. A meu Professor e Orientador **Antônio Carlos de Freitas**, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa e pela sua confiança depositada em mim.

A todos os meus bons e velhos amigos que tive o prazer de conhecer durante este novo período da minha vida, em especial a cinco grandes amigos que nunca esquecerei, **Danielle, Darlan, Edvaldo Júnior, Herman e Thiago Henrique**, que me ajudaram muito e fizeram a minha morada em Recife se tornar a minha segunda casa. Aos amigos que fiz na Universidade Federal de Pernambuco e Recife, vocês tornaram a vida em Recife mais feliz e divertida.

A meus colegas e amigos de trabalho, que dividiram comigo muitos aprendizados e ensinamentos, em especial a minha querida amiga **Nayara Pontes**, que foi crucial no meu desenvolvimento técnico científico no laboratório, além de ter se tornado uma grande amiga e a todos meus amigos do **LEMTE, e Laboratório Central**.

A todos os profissionais do Instituto **Agrônomo de Pernambuco (IPA)**, pela colaboração com nosso trabalho, cuidados com os animais do estudo e coleta dos materiais.

A todos os funcionários do **Laboratório Central** e do **PPGIT**, em particular a **Paulo Germano**, pela paciência e ajuda, e a **Nadja** pelo apoio com alguns dos experimentos.

Por fim, a todos aqueles que acreditaram em mim, que através dos mais simples gestos, fizeram valer a pena todas as experiências vividas durante este tempo.

Obrigado!

RESUMO

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma doença crônica inflamatória e neoplásica da bexiga urinária de bovinos. A doença evolui durante um longo período de tempo, sendo caracterizada pelo desenvolvimento da hematúria intermitente e está associada ao consumo prolongado de *Pteridium aquilinum*, planta conhecida popularmente como samambaia. A infecção pelo *Papilomavírus bovino* tipo 2 (BPV-2) e o consumo de samambaia têm sido relacionadas ao desenvolvimento da HEB e lesões neoplásicas da bexiga de bovinos. Ainda não se sabe o real papel da infecção pelo BPV-2 no desenvolvimento da HEB. Desta forma, o presente trabalho, consiste na avaliação da infecção pelo BPV-2 no desenvolvimento da HEB. Para isto, foi investigada a presença do BPV-2 no sangue, urina e lesões, seguido de avaliações clínicas e laboratoriais e a relação destes, com o desenvolvimento ou não de HEB. Foram selecionados 16 animais da raça Girolando 5/8, fêmeas, com idades entre 2-5 anos, com ou sem lesões. As amostras sanguíneas foram coletadas através de punção venosa da jugular, para a extração de DNA e análises bioquímicas. As amostras de sangue para a extração de DNA foram armazenadas em tubos com anticoagulante (EDTA), e as amostras para análise bioquímica foram armazenadas em tubo sem anticoagulante. As amostras de urina foram coletadas através de micção espontânea, para a realização da urinálise. Para extração de DNA do sangue, urina e lesão, foi utilizado o kit Blood and Tissue (Qiagen, Alemanha). Em seguida foi feita a detecção e tipificação, por PCR, das sequências de DNA. Para detecção foram utilizados os *primers* consenso MY11/09 e *primers* específicos de BPV-2 para a tipificação. Todas as análises foram realizadas a cada 4 meses, durante o período de um ano. Os resultados obtidos demonstraram a detecção do BPV-2 em 100% (16/16) das amostras de sangue, 87,5% (14/16) na urina e 100% (13/13) nas lesões. Os resultados das análises bioquímicas e de urinálise se mostraram dentro da normalidade em todos os animais. Nenhum animal apresentou qualquer característica clínica de HEB. Conclui-se que, o vírus não é *per se*, capaz de desenvolver a HEB.

Palavras-chave: Papilomavírus bovino. Papilomavírus bovino tipo 2. Hematúria enzoótica bovina.

ABSTRACT

Bovine enzootic hematuria (HEB) is a chronic inflammatory and neoplastic disease of the urinary bladder of cattle. The disease evolves over a long period of time, characterized by the development of intermittent hematuria and is associated with prolonged consumption of *Pteridium aquilinum*, a plant popularly known as fern. Bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) infection and fern consumption have been related to the development of HEB and neoplastic lesions of the bovine bladder. The role of BPV-2 infection in the development of HEB is not yet known. Thus, the present study consists of the evaluation of BPV-2 infection in the development of HEB. For this purpose, the presence of BPV-2 in the blood, urine and lesions was investigated, followed by clinical and laboratory evaluations and their relation with the development of HEB. Sixteen Girolando 5/8 females, aged 2-5 years, with or without lesions were selected. Blood samples were collected through venous puncture of the jugular, for DNA extraction and biochemical analyzes. Blood samples for DNA extraction were stored in tubes with anticoagulant (EDTA), and the samples for biochemical analysis were stored in tube without anticoagulant. Urine samples were collected through spontaneous urination to perform the urinalysis. For DNA extraction from blood, urine and injury, the Blood and Tissue kit (Qiagen, Germany) was used. PCR detection and typing of the DNA sequences was then performed. For detection, MY11 / 09 consensus primers and BPV-2 specific primers were used for typing. All analyzes were performed every 4 months for a period of one year. The results demonstrated the detection of BPV-2 in 100% (16/16) of the blood samples, 87.5% (14/16) in the urine and 100% (13/13) in the lesions. The results of biochemical and urinalysis tests were within normal limits in all animals. No animal had any clinical features of HEB. It is concluded that, the virus is not per se, capable of developing HEB.

Keywords: Bovine papillomavirus. Bovine papillomavirus type 2. Enzootic bovine hematuria.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA.....	11
2.2 EPIDEMIOLOGIA DA HEB.....	13
2.3 DIAGNÓSTICO DA HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA.....	14
2.4 PAPILOMAVÍRUS.....	17
2.5 PAPILOMAVÍRUS BOVINO.....	19
2.6 PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPO 2 E HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA.....	24
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....	28
3.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....	29
4.2 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	29
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA	30
4.4 DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE BPV-2	30
4.5 PERÍODO DE INTERVALO DAS AVALIAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS.....	31
4.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	31
4.7 URINÁLISE.....	32
5 RESULTADOS.....	33
5.1 DETECÇÃO GERAL DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO.....	33
5.2 GENOTIPAGEM PARA BPV-2.....	33
5.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	38
5.4 URINÁLISE.....	39
6 DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICE A – EXAME VISUAL, QUÍMICO E MICROSCÓPICO DA URINA DE BOVINOS ADULTOS FÊMEAS DA RAÇA GIROLANDO 5/8 DA CIDADE DE ITAMBÉ-PE.....	54

1 INTRODUÇÃO

A Hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma doença inflamatória crônica e neoplásica da bexiga urinária de bovinos, relacionada com o desenvolvimento de leucopenia, anemia e redução do número de hemoglobina nos animais afetados. Seu diagnóstico clínico se dá através da identificação de eritrócitos na urina. HEB é uma doença endêmica mundial e está associada à neoplasia da bexiga urinária. Essa enfermidade apresenta alta prevalência em regiões onde o pasto está infestado por samambaia, tornando-se endêmica em diversas regiões do mundo como Europa continental, Quênia, China, Índia, Nova Zelândia e Brasil. No Brasil, a doença já foi relatada nas regiões Sul e Sudeste do país, em estados como Bahia, Acre, Mato Grosso do Sul e Pernambuco.

Dentre os fatores que podem ocasionar o desenvolvimento do HEB está a infecção pelo *Papilomavírus bovino* associado ao consumo de samambaia. O *Papilomavirus bovino* (BPV) é um grupo de vírus de DNA circular de cadeia dupla com cerca de 8000 nucleotídeos, não envelopados, de 55-60 nm de diâmetro. Seu genoma é composto por três regiões: região de longo controle (*long control region*-LCR) que contém os sinais responsáveis pela replicação e transcrição do DNA viral, e ainda as regiões codificantes para genes precoces e tardios. Os BPVs pertencem à família *Papillomaviridae*, possuem potencial oncogênico e infectam mucosas e epitélio de muitos animais causando diversas lesões hiperproliferativas, neoplasias benignas ou malignas. Os BPVs são os agentes etiológicos da papilomatose bovina, doença que causa diversos prejuízos econômicos relacionados à depreciação do couro, queda na produção de leite, mastites e consequente diminuição no ganho de peso de animais destinados ao abate.

Os BPVs estão classificados em quatro diferentes gêneros: *Xipapilomavirus*, *Deltapapilomavirus*, *Epsilonpapilomavirus* e *Dyoxipapillomavirus* e 15 tipos virais. Dentre estes tipos encontra-se o Papilomavírus bovino tipo 2 (BPV-2), um fibropapilomavírus que pode levar ao desenvolvimento de papilomas na pele, trato digestivo e bexiga urinária de bovinos. Estudos realizados apontam para uma forte relação entre o BPV-2 e *Pteridium aquilinum* (planta conhecida popularmente como samambaia) no desenvolvimento da hematúria enzoótica bovina e câncer de bexiga.

O DNA de BPV-2 foi encontrado em 69% dos tumores de bexiga experimentalmente produzidos e em 47% dos casos que ocorreram naturalmente. Acredita-se que a progressão maligna das lesões na bexiga urinária de animais com HEB, é resultado de uma interação entre a infecção pelo BPV-2 e compostos imunossupressores e mutagênicos presentes na samambaia. A incidência destes tumores em bovinos varia em pastagens infestadas com samambaia, podendo ser maior que 90% e afetando principalmente animais adultos. O BPV-2 e a intoxicação crônica resultante da ingestão de samambaia estão intimamente associados com a HEB em animais adultos. A manifestação clínica mais importante da doença e que atua como forte indicador de carcinogênese é a presença de sangue na urina.

Um estudo experimental foi desenvolvido através de injeção de DNA de BPV-2 em vacas saudáveis e isentas de samambaia na dieta. Decorrido um período de 18 meses com acompanhamentos destes animais observou-se o desenvolvimento de tumores produzidos em 13 dos 15 animais estudados, sugerindo que o BPV, *per se*, pode causar o desenvolvimento de hematúria e câncer de bexiga. Apesar dos resultados obtidos, o trabalho não é esclarecedor, visto que, a infecção pelo BPV foi feita de forma induzida, onde o vírus foi injetado através de uma via não natural e em quantidades que não são comuns de ocorrerem naturalmente. Diversos estudos têm investigado a presença de BPV-2 em tumores de bexiga de bovinos com HEB provenientes de áreas endêmicas, com pastos infestados por samambaia, ou em infecções experimentais pelo vírus. No entanto, nenhum estudo investigou se ocorre o desenvolvimento de HEB em animais naturalmente infectados pelo BPV-2 com pastagens livres de samambaia. Uma contra prova do desenvolvimento de HEB em animais expostos à samambaia, infectados ou não com BPV-2, seria essencial no estudo do sinergismo entre o BPV-2 e a imunossupressão e ou reativação viral.

Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo, verificar se animais naturalmente infectados por BPV-2, com uma dieta livre de samambaia, podem desenvolver HEB.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA

Hematúria Enzoótica Bovina (HEB) é uma doença crônica, não infecciosa que afeta o gado de ambos os sexos, geralmente, com idade superior há dois anos. (Gabriel et al., 2009). Os sinais clínicos (figura 1) mais comuns apresentados pelos animais com a forma crônica da HEB são caracterizados principalmente por alterações na coloração da urina e alterações físicas dos animais acometidos. Os primeiros sintomas apresentados são urina escura, incontinência urinária, emagrecimento rápido e progressivo, hematúria intermitente, prostração, uremia, arqueamento, decúbito lateral, fraqueza e consequente morte (Tokarnia et al., 2000; Souto et al., 2006; Radostitis et al., 2007; Gabriel et al., 2009).

Figura 1 - Bovino em decúbito esternal após urinar um coágulo (à esquerda), bovino com grande perda de peso (à direita).



Fonte: Adaptado de Galvão et al. (2012).

A HEB é causada pela ingestão prolongada de *Pteridium spp.*, planta conhecida popularmente como “samambaia-do-campo” ou “samambaia”. *Pteridium aquilinum* (figura 2), está distribuída mundialmente, pertence à família Polypodiaceae e ao gênero *Pteridium*. A samambaia é uma planta tóxica, perene, rizomatosa, ereta e ramificada (50- 180 cm de altura), suas folhas formam touceiras densas e rizomas bastante enterrados proporcionando a planta maior resistência, até mesmo a queimadas (Falbo et al., 2005).

Figura 2 - Campo infestado por *Pteridium aquilinum*



Fonte: (Disponível em <http://www.ufsm.br/lpv>).

Sabe-se que a planta contém um número significativo de componentes tóxicos, sendo um dos principais, o Ptaquilosídeo um glicosídeo sesquiterpenoide que possui atividade mutagênica e carcinogênica (Smith, 1997; Carvalho et al., 2006). Portanto, o consumo prologando da planta implica no desenvolvimento de lesões tanto inflamatórias como neoplásicas da bexiga urinária, resultando em diversas manifestações clínicas características da doença, sendo a principal e mais comum a anemia severa causada pela hematúria intermitente, que pode levar a morte do animal (Falbo et al., 2005; Souto et al., 2006; Cota et al., 2015). Além disso, pode ocorrer o desenvolvimento de algumas síndromes já bem estabelecidas, além de neoplasias na faringe, esôfago e bexiga como resultados do consumo da planta (Yamada et al., 2007).

A intoxicação causada pela ingestão de samambaia pode ser manifestada de duas formas, uma crônica e outra aguda. As formas crônicas podem ser caracterizadas pelo desenvolvimento de lesões na bexiga e/ou trato digestivo e consequente desenvolvimento de neoplasias em ambos os locais. A lesão que se dá na bexiga urinária é chamada de hematúria enzoótica, e quando essa manifestação se dá de forma aguda ela é chamada de síndrome hemorrágica. Dados os problemas causados pela doença, a mesma é de grande importância do ponto de vista econômico (Marçal et al., 2002; Rissi et al., 2007; Furlan et al., 2014).

A intoxicação do gado pela samambaia é caracterizada pela falha na atividade da medula óssea, acarretando em casos graves de leucopenia, trombocitopenia e crise hemorrágica. Outro sinal clínico grave da doença, porém menos comum, é a cegueira brilhante, também conhecida como degeneração progressiva da retina (PRD). A PRD tem sido observada tanto em ovinos quanto em bovinos (Yamada et al., 2007).

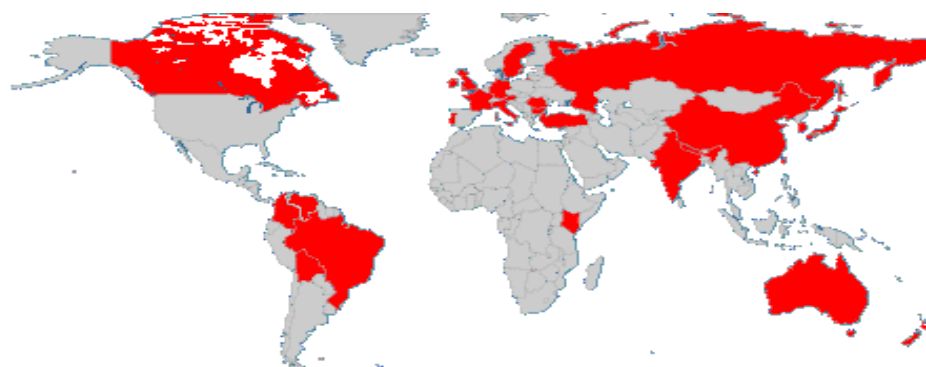
O desenvolvimento da HEB se dá pela ingestão de samambaia (*P. Aquilinum*)

por bovinos em pequenas quantidades, durante um longo período de tempo (um ano ou mais). Um estudo mostrou que a quantidade necessária para o desenvolvimento da HEB está estabelecida em quantidades inferiores a 10g Kg dia (Tokarnia et al., 2000). Entretanto, bovinos que ingeriram quantidades superiores a 10g Kg dia durante um curto período (2-11 semanas) podem desenvolver a diátese hemorrágica, que se manifesta nos animais em forma de síndrome hemorrágica. Outros sintomas como petéquias visíveis na pele e mucosas, diarreia com sangue e hemorragias em locais de punção por agulha também podem ocorrer. O animal acometido pela diátese hemorrágica pode vir a morrer em até 72 horas após o aparecimento dos sintomas (Tokarnia et al, 2000; da Silva & Nunes, 2012). A associação entre o consumo de samambaia com a etiologia da HEB se deu a partir da observação da presença da planta em locais onde a doença era comum (Tokarnia et al.,1969, Jarrett et al., 1978, Souto et al., 2006).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA HEB

A hematúria enzoótica é uma doença de caráter endêmico que está diretamente relacionada ao consumo de *P. aquilinum*. Essa espécie é amplamente distribuída por várias regiões ao redor do mundo (figura 3), como Europa, Ásia Central, China, Japão, Índia, Filipinas, América do Sul, América Central até em regiões do Canadá (Fenwik, 1988, Marçal, 2003). É na época de seca que o gado costuma se alimentar da samambaia, onde o pasto encontra-se escasso e a vegetação é pobre. As informações sobre incidência da HEB não são próximas da realidade, visto que os casos de HEB geralmente são reportados por donos de abatedores ou em hospitais veterinários onde os animais estão sendo tratados. Dessa forma, o número de casos reportados representa apenas uma pequena parcela dos casos reais de hematúria (Sharma, 2012).

Figura 3. Casos relatados de Hematúria Enzoótica no mundo.



Fonte: Oliveira (2009).

No Brasil, a doença tem sido relatada em locais que apresentam uma variação de altitude entre 200 e 1000 metros, onde foram comprovados diversos casos de HEB como os estados de Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Amazônia, Paraná (Peixoto et al., 2003; Aparecida da Silva et al., 2009).

A variação na prevalência da doença pode ser atribuída devido às práticas de criação de gado e pelas condições ambientais, um exemplo é o Brasil onde as maiores manifestações clínicas de surto da doença ocorrem durante o inverno e (Smith et al. 1994a; Marçal, 2001; Pinto et al., 2004; Marrero et al., 2004, Sharma, 2012). Não existe predisposição ao consumo de samambaia com relação ao sexo, no entanto, a doença é mais frequente em fêmeas grávidas (Aparecida da Silva et al., 2009).

2.3 DIAGNÓSTICO DA HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA

Diversos fatores devem ser levados em consideração para que se possa obter um diagnóstico correto de HEB, esses fatores variam desde a observações das primeiras manifestações clínicas, até o seu diagnóstico diferencial através de exames específicos favorecendo uma maior rapidez no diagnóstico e a tomada de medidas preventivas para o restante do gado. Em primeiro lugar deve-se investigar se há presença da samambaia na propriedade, a anamnese investigativa é importante nesses casos e o histórico de compra dos animais afetados, visto que podem ter sido adquiridos já doentes (Gabriel et al., 2009). A coleta de urina, por exemplo, se faz extremamente necessária, já que a primeira e mais clara manifestação clínica da doença é a presença de sangue na urina (Marçal, 2003; Gabriel et al., 2009).

Uma série de exames pode ser realizada para o diagnóstico diferencial da HEB, são exames que variam desde o hemograma até a análise de material de necropsia.

Em animais com HEB, o hematócrito e hemoglobina se apresentam com valores reduzidos devido a anemia arregeniativa causada pela doença, aumento da fragilidade nos eritrócitos, linfocitose e neutropenia causados pela inflamação crônica, além de quadros de linfopenia e leucocitose por neutrofilia (Gabriel et al., 2009; da Silva & Nunes, 2012).

Os animais podem apresentar a macrohematúria que é uma condição que se dá pela formação de coágulos de sangue na urina, logo após a centrifugação, sendo possível a visualização. Em alguns casos, os animais também apresentam quadros de microhematúria, uma forma subclínica da doença onde não é possível a visualização do sangue macroscopicamente, podendo revelar hematócrito normal após o hemograma (Falbo et al., 2005, da Silva & Nunes, 2012).

Além dos exames hematológicos, é muito importante que exames de urina sejam realizados no diagnóstico da HEB (figura 4). Isso se dá pela facilidade da obtenção das amostras, e pelo grau de especificidade e sensibilidade que o exame apresenta. Esses testes são realizados em duas etapas principais, a primeira através do exame de sedimento e a segunda etapa que é realizada através de tiras reativas, proporcionando a capacidade de diferenciar a macro da microhematúria (Sánchez-Vilalobos et al, 2006).

Figura 4 - Coleta de urina para realização de urinálise; amostra de urina normal (N) e amostras dos Bovinos 17, 21-24 com diferentes graus de hematúria.



Fonte: Galvão et al. (2012).

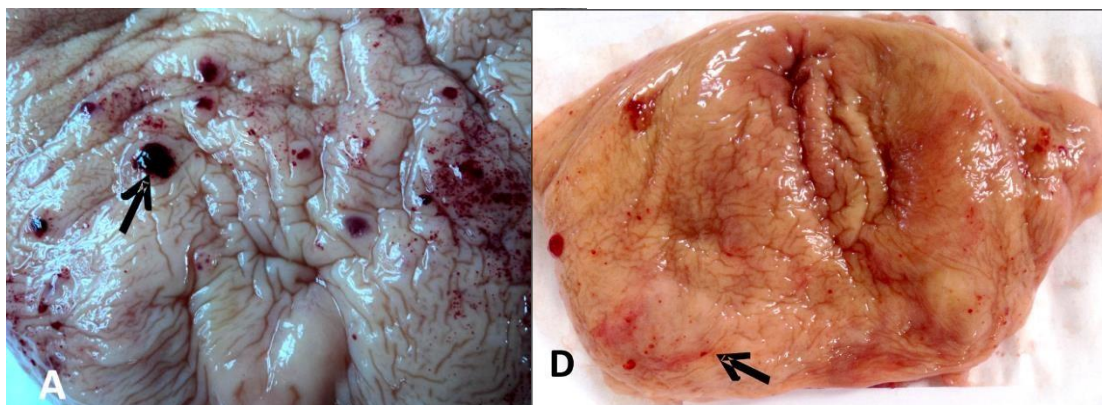
Os achados mais comuns nos testes bioquímicos são caracterizados pela diminuição dos níveis séricos de cálcio, fósforo, além do aumento da creatinina sérica e fosfatase ácida, também se observam elevações nos níveis de uréia (Singh et al., 1973; Favarato et al., 2011). Apesar das formas clínicas da doença ser bem estabelecidas, é importante considerar outras doenças que tem sintomatologia parecida, é o caso da hemoglobínúria, onde através do teste de urina colhido na própria fazenda pode-se verificar se houve a formação do sedimento, fato que não ocorre

quando se tem hemoglobinúria por hemoparasitose ou por outra causa (Marçal, 2001; Da silva & Nunes, 2012).

O diagnóstico da hematúria também pode ser feito analisando os aspectos macroscópicos e microscópicos das lesões. Animais acometidos por HEB podem desenvolver diferentes aspectos macroscópicos de lesões neoplásicas na bexiga urinária, e dependendo da vascularização, os tumores podem ser pálidos ou hemorrágicos. Além disso, diferenças entre o tamanho e formato das lesões podem existir dependendo do tipo de crescimento (endofílico ou infiltrativo), variando de forma moderada ou acentuada a cor da bexiga de animais afetados (Carvalho et al., 2006, Gabriel et al., 2009).

Na necropsia dos animais afetados por HEB é possível visualizar diversos achados macroscópicos (figura 5), dentre eles os mais comuns estão caracterizados por múltiplas formações polipoides, múltiplas elevações avermelhadas, petéquias e presença de massa tumoral firme com superfície amarelada e irregular. Tumores, presença de urina vermelha, ulceração e acúmulo de fibrina também são encontrados na mucosa vesical de animais com HEB (Falbo et al., 2005; da Silva & Nunes, 2012).

Figura 5 - Lesões macroscópicas encontradas na mucosa da bexiga de bovinos com hematúria enzoótica. A - lesão hemangiomatosa (seta) e petéquias (cabeça de seta) B – lesão brancacenta deprimida (seta).



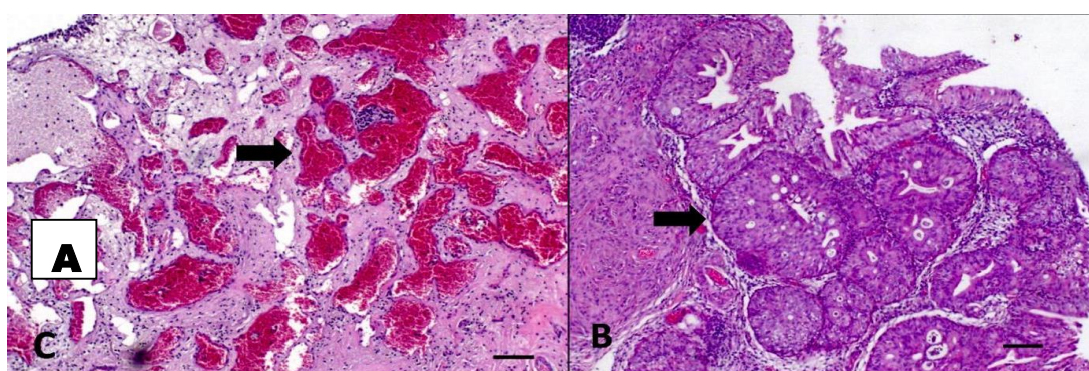
Fonte: Silva et al. (2012).

O diagnóstico microscópico da HEB se dá pela análise das estruturas histológicas da bexiga urinária e também constitui um importante método diagnóstico para a confirmação da doença (figura 6). Nos bovinos com HEB pode se observar lesões não neoplásicas caracterizadas por espessura variada das camadas do epitélio transicional, além de diferentes formações metaplásicas como displasia, metaplasia epitelial escamosa, infiltrados inflamatórios, fibrose, cistite e ninhos de Brunn (Oliveira, 2009; da Silva & Nunes, 2012). Existe uma grande variedade de tipos neoplásicos em

bovinos acometidos por HEB, essas neoplasias podem ser tanto de origem epitelial quando mesenquimal. Hemangiomas, hemangiosarcomas, rabdomiossarcoma e fibroma são alguns dos tipos de lesões neoplásicas de origem mesenquimal encontradas na bexiga de bovinos com HEB (Carvalho et al., 2006; Gabriel et al, 2009).

No caso dos tumores de origem epitelial podem ser citados o carcinoma de células escamosas, adenoma, papiloma invertido, carcinoma transicional tipo ninhado, carcinoma tubular e adenocarcinoma (Peixoto et al., 2003; Carvalho et al., 2006).

Figura 6 - A - Lesão neoplásica de origem mesenquimal (hemangioma) à esquerda; B - Lesão neoplásica de origem epitelial (adenocarcinoma) à direita.



Fonte: Silva et al. (2012).

Estudos têm apontado que a interação entre as substâncias cancerígenas presentes na samambaia e a infecção pelo *Papilomavírus bovino tipo 2* podem levar ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas da bexiga no bovino, essa interação também pode evoluir para os sinais clínicos da HEB (Marçal, 2002; Campo, 2006; Bocaneti et al., 2014).

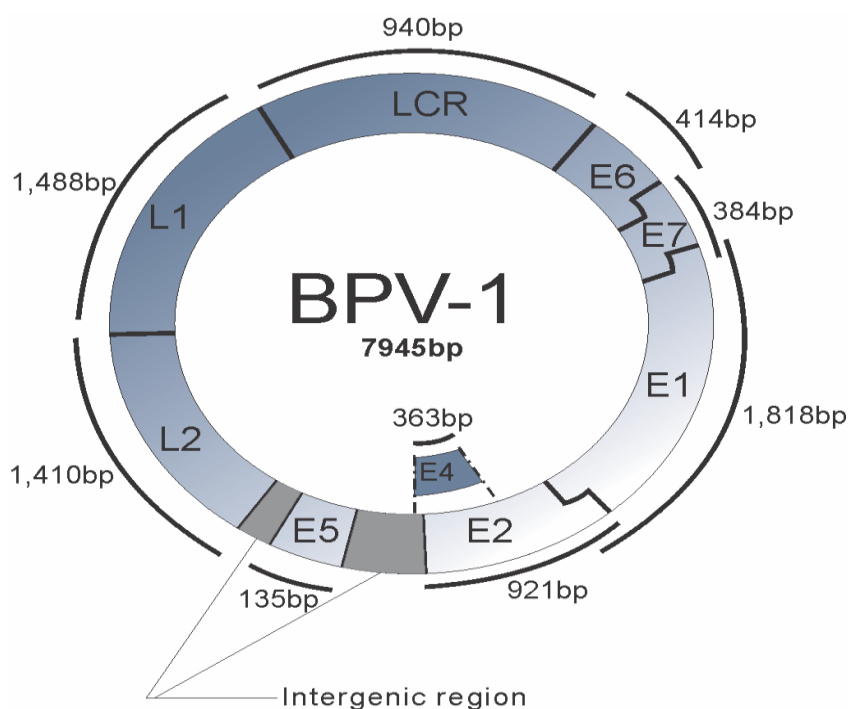
2.4 PAPILOMAVÍRUS

Os papilomavírus (PVs), pertencem a família *Papillomaviridae*, abrange 29 gêneros e mais de 200 tipos virais, fazem parte de um grupo bem diversificado de vírus que afetam os amniotas (Bernard et al, 2010; Freitas et al., 2011). São vírus tidos como espécie-específico, mas, que podem causar infecções cruzadas em outros animais, como equídeos por exemplo. São pequenos vírus de DNA de fita dupla circular, não envelopados, de formato icosaedro com diâmetro entre 52-55 nm. Seu genoma possui cerca de 8 Kb e peso molecular de cerca de $5,6 \times 10^2$ Dalton. Estes vírus possuem a capacidade de causar diversas alterações tumorais, a maioria benigna, nos tecidos epiteliais de diversos mamíferos e até mesmo de aves e répteis (Silva et al., 2012).

De forma geral, o seu genoma pode ser dividido em três regiões principais: precoce E (early), tardia L (late) e, longa região de controle (long control region) ou LCR (Figura 7). Os genes precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) codificam as proteínas envolvidas na replicação e transcrição do DNA viral (de Villiers et al.,2004; Zheng & Baker, 2006).

E5, E6 e E7 são responsáveis pela modulação no processo de transformação, seguidos de duas proteínas reguladoras E1 e E2, que modulam a transcrição e replicação. L1 e L2 são proteínas estruturais que compõem o capsídeo viral. Uma região não codificadora (NCR), também conhecida como região de controle longo (LCR), contém a origem de replicação, potencial de transcrição e sequências promotoras. Presente em todos os genomas de papilomavírus está localizada entre o final de L1 e o início da primeira ORF, na região inicial (E6 no caso de BPV-1) (de Villiers et al.,2004; Zheng & Baker, 2006).

Figura 7- Organização do genoma de BPV1. Representação em círculo do genoma viral, e as respectivas posições dos genes virais E6, E7, E1, E2, E4, E5, L2, L1 e o LCR entre os genes L1 e E6.



Fonte: Freitas et al. (2011).

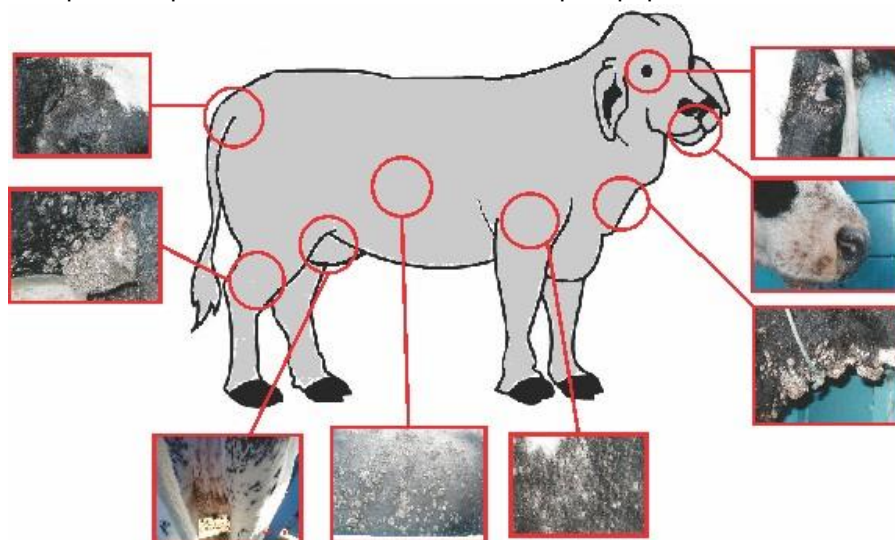
2.5 PAPILOMAVÍRUS BOVINO

Os BPVs fazem parte de um grupo heterogêneo de vírus, são epiteliotrópicos e o seu hospedeiro natural é o bovino. O vírus, além de induzir doenças nos animais, é utilizado como um importante modelo *in vivo* para o estudo de HPV. Os BPVs estão associados ao desenvolvimento de lesões cutâneas e mucosas causadas por papilomas, podendo regredir naturalmente ou levar ao desenvolvimento de tumores malignos quando associados a importantes co-fatores ambientais (Freitas et al., 2011, Batista et al., 2013).

Os BPVs estão classificados e caracterizados em quatro diferentes gêneros, Deltapapillomavirus (BPV-1,-2, -13 e -14), Xipapillomavirus (BPV-3, -4, -6, -9, -10, -11, -12 e -15) e Epsilonpapillomavirus (BPV-5 e -8) e Dyoxipapillomavirus (BPV-7) (Tomita et al., 2007; Bernard et al., 2010; Lunardi et al., 2013; Rector & Van Ranst, 2013; Munday et al., 2015, Roperto et al., 2016; Savini et al., 2016; Da Silva et al., 2016).

Os BPVs são os responsáveis pelo desenvolvimento da Papilomatose Bovina, doença também conhecida como figueira. É uma doença infecto-contagiosa crônica, viral e descrita em várias espécies, dentre elas o gado, cachorros, cavalos e búfalos (Nascimento, 2002; Kumar et al., 2012). A doença se manifesta em diferentes regiões do corpo dos animais (Figura 8), nos bovinos ocorre à manifestação através de tumorações nas regiões do rúmen, genitália, esôfago, cabeça, ao redor dos olhos, pescoço, úbere e pele (Murphy et al., 1999; Marins, 2004; Freitas et al., 2011).

Figura 8 - Esquema representativo dos locais afetados pela papilomatose bovina no bovino.



Fonte: Freitas et al. (2011).

Nos bovinos a doença é mais comum em animais jovens com idades inferiores há dois anos, infecta células basais do epitélio e fibroblastos (Jesus, 2008) e induzem a hiperplasia do epitélio, conhecidas popularmente de verrugas, causando diversas infecções assintomáticas além de lesões benignas ou malignas (Monteiro, 2007).

Animais com papilomatose estão mais sujeitos a infecções bacterianas secundárias, complicações causadas pelas feridas mecânicas, que frequentemente resultam em dermatite necrótica, além de outros sérios problemas como hemorragias e miíase. São frequentes em animais que acabam sofrendo algum tipo de lesão nas verrugas levando a transtornos gerais tóxicos e até mesmo a septicemia e morte do animal (Hama et al. 1988; Rosenberger, 1993). Quando essas lesões afetam outras regiões no animal, o crescimento exacerbado de verrugas pode levar a obstrução das tetas, por exemplo, impedindo a ordenha, e no caso dos machos, verrugas no pênis podem levar ao impedimento do coito (Monteiro et al., 2008).

A infecção pelo BPV se dá principalmente através de inoculação cutânea, mas também pode ser adquirido por contato indireto, seja por meio de vetores (moscas, carrapatos) ou contato com equipamentos coletivos (máquina de marcação, cercas, ordenhadeiras, bebedouros e comedouros) e contato direto por via transplacentária (Murphy et al., 1999; Wosiacki, 2002).

Os BPVs são caracterizados de acordo com o tipo de lesão que provocam nos animais (figura 9), como papilomas na pele (BPV -1, -2 e -3); papilomas no pênis (BPV-1); papilomas nos tetos e úbere (BPV -1, -5 e -6); e câncer na bexiga e trato gastrointestinal superior causados pelos BPVs -2 e -4 respectivamente (Campo, 2002; Souto et al., 2006; Jesus, 2008). Os BPVS -1, -2 e -3 fazem parte do grupo A, e são responsáveis pelo desenvolvimento de fibropapilomas, os demais são responsáveis pelo desenvolvimento do chamado papiloma verdadeiro, localizados na pele, e mucosas do trato gastrointestinal superior, causado pelo BPV 4 (Souto et al., 2006).

Figura 9 - Infecção sintomática da papilomatose bovina. A. Fibropapilomas na cabeça e pescoço causados por BPV2. B. Papilomas epiteliais em tetas causados por BPV6. C. Fibropapilomas no pênis causados por BPV1.



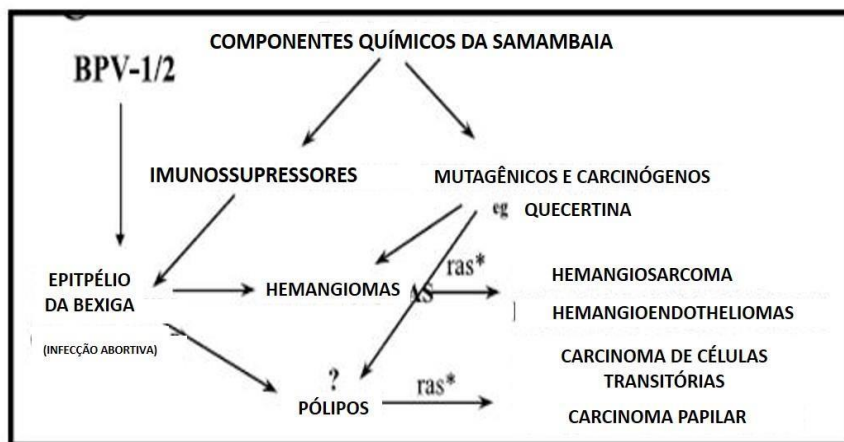
Fonte: Hatama (2012).

Apesar de serem tidos como espécie específicos, os BPVs -1 e -2 conseguem infectar diferentes espécies e podem levar ao desenvolvimento de tumores sarcóides, tumores bastante invasivos e de pouca resposta a tratamentos, causando grandes prejuízos aos criadores, principalmente de cavalos e mulas (Wosiack, 2002; Jesus, 2008).

A infecção pelo BPV -2 pode ocasionar o desenvolvimento de lesões neoplásicas, e está relacionada ao desenvolvimento do câncer de bexiga urinária (Borzacchiello et al., 2003), estudos têm apontado para uma relação sinérgica entre a infecção pelo BPV -2 e o ptaquilosídeo (composto presente nos brotos da samambaia) na etiologia da hematúria enzoótica bovina (Figura 10) (Campo, 2002; Leal et al., 2003; Campo, 2006).

O DNA de BPV 2 têm sido constantemente encontrado em diversos tumores de bexigas em animais com HEB, na Itália. Um estudo realizado com amostras de tumores de bexiga de bovinos, detectou a presença do BPV-2 em 77% das amostras estudadas (Borzacchiello et al., 2003), porém o papel do vírus no desenvolvimento da doença ainda é desconhecido (Wosiacki et al., 2005; Campo, 2006).

Figura 10 - Relação do vírus com os componentes químicos da samambaia e o desenvolvimento do câncer de bexiga.



Fonte: Campo (2002).

A papilomatose bovina é uma grande problemática econômica, por causar diversos danos aos animais, como depreciação do couro, significativo emagrecimento do animal e diminuição na produção de leite (Freitas et al., 2011), causando assim diversos prejuízos aos criadores de gado que lidam com a doença, endêmica em diversas regiões do Brasil. Segundo dados, o Brasil encontra-se como o sexto maior produtor de leite e um dos líderes em exportação de carne bovina (MAPA, 2015).

A papilomatose bovina é uma doença cosmopolita, vários casos da papilomatose têm sido registrados ao redor do mundo (figura 11), em países como Brasil, Estados Unidos, Índia, Japão, Alemanha e Itália (Campo, 1995; Ogawa et al., 2004; Singh et al., 2009; Bocaneti et al., 2014).

Já existem diversos métodos diagnósticos da papilomatose bovina. O mais simples desses exames é o teste clínico, realizado a partir da identificação das lesões nos animais, esse teste só é possível em animais sintomáticos (Betiol et al., 2012). Testes de identificação histológica através de métodos de coloração também são utilizados de forma auxiliar, servindo como determinação do diagnóstico de lesões papilomatosas. Outra técnica sugerida como metodologia para identificação dos PVs é a imunohistoquímica, teste que consiste na detecção do revestimento proteico das partículas virais, no entanto não é utilizada como método de escolha para o diagnóstico por ser uma técnica cara e que detecta o vírus apenas durante a fase de liberação (Lancellotti et al., 2000).

Os métodos moleculares são mais baratos quando comparados a imunohistoquímica e possuem uma maior reprodutibilidade. São utilizados na detecção do DNA viral. A hibridização fluorescente *in situ* (FISH), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- Polimorfismo de Fragmento de restrição), reação em cadeia de polimerase (PCR), sequenciamento, *Southern* e *Dot* blot (Moljn et al., 2005) são técnicas eficientes, sendo a PCR a mais sensível (Araldi et al., 2014) devido a seu alto grau de sensibilidade e especificidade, tornando-se a técnica mais adequada para a detecção dos PVs (Moljn et al., 2005).

2.6 PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPO 2 E HEMATÚRIA ENZOÓTICA BOVINA

Existe uma forte associação de caráter geográfico entre a presença da samambaia nas pastagens com o aparecimento de HEB, devido a isto, a doença por muito tempo esteve apenas associada com a alimentação dos bovinos em pastagens infestadas pela planta. Entretanto, novos estudos foram realizados associando a infecção pelo BPV-2 ao desenvolvimento da HEB (Wosiacki et al., 2002). Essa associação se dá principalmente pela presença do vírus em lesões neoplásicas da bexiga urinária de bovinos adultos acometidos pela HEB (Campo et al., 1992; Campo, 1997).

A detecção do vírus em papilomas e carcinomas na bexiga de bovinos com HEB foi sugerida primeiramente através da detecção de corpúsculos de inclusão, característicos da infecção pelo vírus, em células tumorais (Jarrett, 1978).

Campo (1992), em um estudo experimental, detectou a presença do DNA de BPV-2 em 69% das lesões induzidas experimentalmente e em 46% dos casos de

câncer de bexiga que ocorreram naturalmente, sugerindo uma forte relação entre BPV e câncer de bexiga. Neste estudo as vacas foram alimentadas com samambaia e desenvolveram câncer de bexiga urinária de origem vascular e epitelial, os dois chegaram a ocorrer em uma mesma bexiga. Ainda segundo o autor, a imunossupressão pode ter ativado o DNA de BPV-2 latente e essa ativação deve ter levado ao desenvolvimento das lesões pré-malignas, porém, isso só foi possível devido a presença dos compostos da samambaia.

Ainda não se sabe ao certo sobre o processo de sinergia entre a infecção pelo BPV-2 e os compostos imunossupressores e oncogênicos presentes nos brotos da samambaia na evolução das lesões malignas da bexiga. Acredita-se que alguns dos constituintes da samambaia, incluindo o PT, podem levar o animal a quadros de imunossupressão através redução da atividade das células *Natural Killers* (NK) reduzindo a ação do sistema imune em combater e eliminar as células infectadas pelo BPV. Desta forma haveria uma persistência maior dos papilomas no animal e evolução para alterações malignas (Campo, 1997; Onions, 1997; Stocco dos Santos et al., 1998; Murphy et al., 1999).

Wosiacki (2002) detectou a presença do DNA de BPV-2 em amostras de bexiga de animais com HEB, a presença do vírus foi detectada em 76,3% (29/38) dos animais estudados, e desse total 80% eram animais alimentados em pastagens endêmicas. Além disso, 10 animais criados em regiões onde não havia samambaia foram escolhidos como grupo controle, nesse grupo os animais não desenvolveram HEB. O DNA de BPV-2 já foi amplificado a partir de amostras de bexiga urinária bovina em várias regiões endêmicas para a HEB (Borzacchiello et al., 2003; Wosiacki et al., 2005; Balcos et al., 2008; Resendes et al., 2011; Pathania et al., 2012). Na Itália, Borzacchiello et al. (2003) detectaram o BPV-2 em amostras de bexiga urinária bovina, 76,7% (46/60) das amostras possuíam lesão neoplásica e 50% (17/34) não tinha lesão. No entanto, a alta taxa de detecção do BPV-2 na bexiga de animais sem lesão se deve a sua obtenção em áreas endêmicas explicando a alta taxa de amostras positivas no grupo controle.

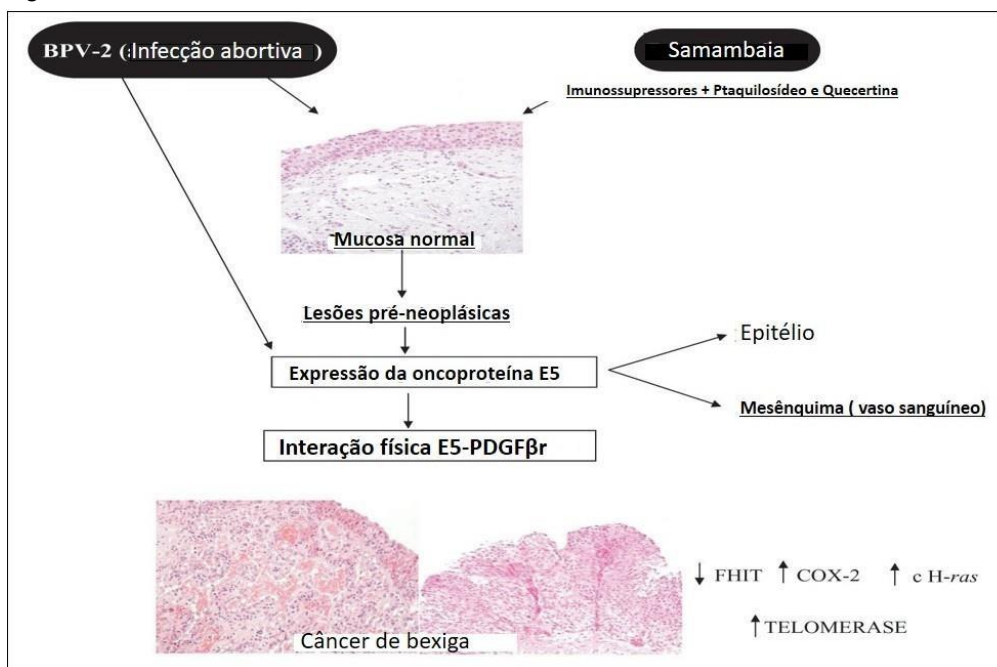
Wosiaki et al., (2006) detectou BPV-2 em 58% (36-68) das amostras de bexiga urinária de animais com HEB. O número de amostras com lesões macroscópicas de bexiga urinária positiva para BPV-2 foi de 67%, no grupo controle (amostras de bexiga sem lesões macroscópicas) a taxa de detecção do BPV-2 foi de 10%, sugerindo assim relação entre o vírus e os componentes presentes na samambaia.

Pathania et al., (2012) avaliando amostras de urina de vacas com e sem lesões neoplásicas da bexiga em áreas endêmicas de HEB verificou que metade dos animais eram positivas para o BPV-2, das 35 amostras analisadas 68,57% se mostraram positivas para BPV-2, estando presente em 15 casos em bexigas com lesões não neoplásicas e 9 casos da presença do vírus em animais afetados por HEB.

Cota et al., (2015) detectou a presença de BPV-2 em diferentes tipos de tecidos de bovinos saudáveis e acometidos pela HEB nos Açores. Dos 38 animais afetados pela HEB, 27 (71%) foram positivos para BPV-2 e 19 desses animais apresentaram uma ou mais lesões na bexiga urinária. O DNA do BPV-2 foi encontrado tanto em animais com lesões na bexiga quanto de animais sem lesões (grupo controle utilizado na pesquisa), destacando que a infecção por BPV-2 não é suficiente para a transformação neoplásica, necessitando dos compostos presentes na samambaia.

Embora esta relação de sinergia entre os componentes presentes na samambaia e a infecção pelo BPV-2 ainda seja pouco compreendida, estes estudos sugerem que o BPV-2 possivelmente infecte a mucosa da bexiga urinária, produzindo uma infecção latente abortiva. Portanto, os animais expostos a agentes imunossupressores (figura 12), princípios mutagênicos e carcinogênicos presentes na samambaia desencadeia uma expressão do gene viral. Esses eventos patológicos estão diretamente relacionados a regulação positiva da atividade da telomerase que se correlaciona com a capacidade do PV de afetar este tipo de regulação (Borzacchiello & Roperto, 2008).

Figura 12 - Representação esquemática dos eventos que levam ao câncer de bexiga urinária em bovinos alimentados com samambaias. O BPV-2 infecta a mucosa da bexiga. Os produtos químicos de samambaia atuam junto com o vírus desencadeando a expressão de oncogene viral (E5, E7). A ligação de E5 à forma ativada do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF β r), a sobreexpressão da ciclooxigenase-2 (COX-2), cH-ras e da telomerase, bem como a regulação negativa do fragmento FHIT.



Fonte: Borzacchiello & Roperto (2008)

Outro achado importante é a detecção do BPV em diferentes sítios, apesar de ser classicamente descrito como epiteliotrópico o DNA de BPV já foi descoberto em diferentes locais, como o sangue periférico, plasma, leite, colostro (Stocco dos Santos et al., 1998; Freitas et al., 2003, Roperto et al., 2008) e até mesmo no sêmen (Silva et al., 2011). A presença do BPV-2 no sangue de vacas que sofriam de HEB e câncer de bexiga sugere que as células do sangue periférico possam servir de reservatório para o vírus permanecer de forma latente, podendo servir como um diagnóstico precoce, evitando o abate do animal (Santos et al., 2013).

Em um trabalho realizado por Stocco dos Santos et al (1998); com animais que não faziam ingestão de samambaia, e que foram infectados experimentalmente pelo BPV-2, durante o período de 18 meses, foi sugerido que, o vírus, *in vivo* teria potencial clastogênico suficiente para causar aberrações cromossômicas. A autora sugeriu que este possível potencial clastogênico do vírus, seria capaz de, *per si*, levar ao desenvolvimento da neoplasia da bexiga, mesmo que em condições ausentes da ingestão da samambaia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar se a infecção natural pelo BPV-2 é suficiente para o desenvolvimento de hematúria enzoótica em bovinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença de BPV-2 na urina, lesão e sangue dos animais acompanhados;
- Avaliar o perfil clínico e laboratorial dos animais acompanhados;
- Comparar os achados clínicos e laboratoriais dos animais BPV positivos quando ao desenvolvimento ou não de hematúria enzoótica bovina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

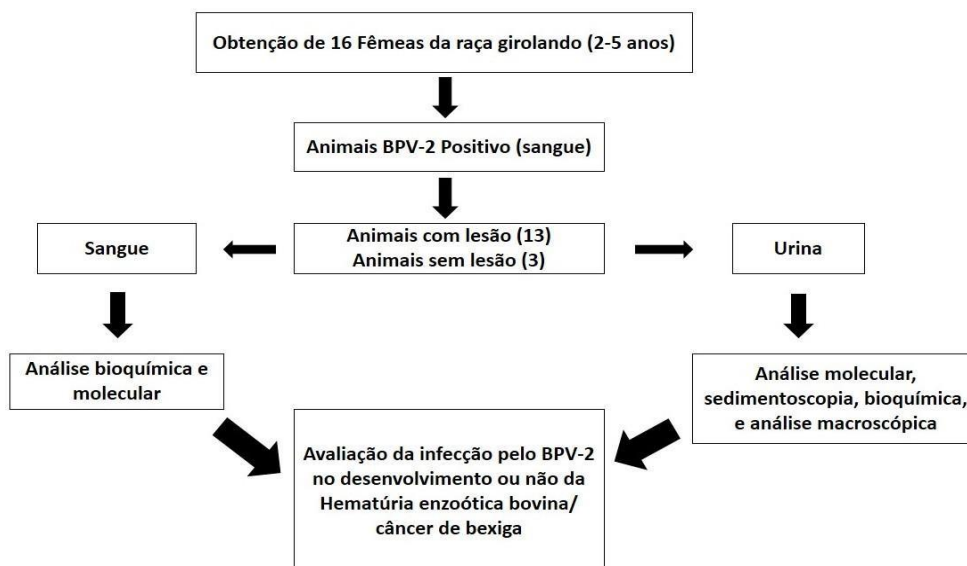
Foram selecionados e acompanhados 16 animais da raça Girolando 5/8, fêmeas, com idade variando entre dois e cinco anos, apresentando ou não lesões cutâneas e pertencentes ao Instituto Agronômico de Pernambuco-IPA, Estação Experimental de Itambé-EEI, localizada na zona da mata, a 102 km do Recife.

As avaliações clínicas para averiguar a presença de HEB foram realizadas por veterinários pesquisadores do IPA. Foram realizadas análises clínicas iniciais para investigação da presença ou não de lesões, e avaliação física dos animais. Dos 16 animais selecionados, 13 tinham lesões e 3 não apresentaram lesões. Em seguida foram realizadas coletas de sangue e urina.

4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para realização do estudo foram coletadas amostras de sangue, urina e lesão (figura 13). As amostras de sangue foram coletadas através de punção venosa da jugular, colhidas em tubo a vácuo, com anticoagulante EDTA (10%) para a realização da extração de DNA, e sem anticoagulante para a realização de testes bioquímicos. As amostras de urina foram colhidas através de micção espontânea. As amostras provenientes de lesões foram coletadas com o auxílio de lâminas de bisturi, dos 16 animais presentes no estudo. Todos os procedimentos de coleta de sangue, pele e urina foram realizados por pesquisadores veterinários do IPA.

Figura 13. Fluxograma representativo da metodologia do estudo.



Fonte: Tibúrcio Júnior (2017)

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Para extração de DNA do sangue, urina e lesão, foi utilizado o kit Blood and Tissue (Qiagen, Alemanha), seguindo as condições indicadas pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado com o auxílio do equipamento NanoVue (GE, Alemanha). A qualidade do DNA extraído foi verificada através de reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene da beta-globina bovina (450 pb) (forward 5'-AACCTCTTTGTTTACAACCAG-3' e reverse 5'-CAGATGCTTAACCCACTGAGC-3') (Freitas et al., 2007).

4.4 DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE BPV-2

Foram utilizados cerca de 100ng de DNA para a análise de PCR. Para a detecção de sequências de DNA de BPV, utilizando *primers* consenso MY11/09 (Fw- 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3' e Rev 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'), de acordo com as condições descritas em Carvalho et al. (2012). Desnaturação inicial a 94°C por 10 minutos, 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. Após a detecção do BPV, as amostras positivas foram submetidas à tipificação por PCR, com *primers* específicos para o BPV-2 segundo condições descritas por Silva et

al. (2011). Desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, a PCR constituiu de 40 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 58°C, 1,0 minuto a 72°C, seguido por uma extensão final a 72°C por 5 minutos. As PCRs para a detecção do BPV-2 foram realizadas por meio de *primers* específicos através do gene L1 de BPV2 Forward - 5' GTT ATA CCA CCC AAA GAA GAC CCT 3' BPV2 Reverse - 5' CTG GTT GCA ACA GCT CTC TTT CTC 3'; 164 pb Gene L1 (6888 – 7051nt GeneBank Access M20219). Foi utilizado genoma do clone de BPV-2 como controle positivo, no controle negativo foi utilizado o máster mix com os primers de BPV-2 e água.

Para realização de eletroforese do DNA foram utilizados géis de agarose a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X. Foi adicionado ao gel solução de brometo de etídeo (0,5 µg/ml) para promover a visualização das bandas de DNA através de um transluminador de luz ultravioleta. O material foi aplicado junto com tampão de amostra (*Loading Dye* 6X), tendo como referencial o marcador de 100pb e 1Kb (GeneRuler DNA Ladder, LoadingDye e água milliQ) e em seguida foto documentado.

4.5 PERÍODO DE INTERVALO DAS AVALIAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

Para o acompanhamento dos animais, os exames bioquímicos e de urinálise foram realizados a cada quatro meses, durante o período de um ano. Este período foi determinado com base no tempo necessário para cobrir o período de aparição dos sintomas da HEB. Sendo avaliados quanto aos sintomas macro e microscópicos da doença, evitando falsos negativos.

4.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Para a realização dos testes bioquímicos, foram colhidos cerca de 10ml de sangue em tubos esterilizados, sem anticoagulante, submetidos à centrifugação (3.000 rotações por minuto, durante cinco minutos) para obtenção do plasma. Os testes selecionados foram utilizados para avaliação da função renal dos animais. Foram realizados os seguintes exames:

- CREATININA: O método utilizado foi o colorimétrico (Kit Creatinina Labtest). A creatinina e outros componentes da amostra reagem com a solução de picrato em meio

alcalino formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente;

- URÉIA: O método utilizado foi o enzimático-colorimétrico para a determinação da uréia em amostras de sangue por reação de ponto final. (Kit Uréia Labtest). A uréia é hidrolisada pela uréase a íons amônio em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol.

4.7 URINÁLISE

Foram realizadas análises da urina de todos os animais presentes no estudo, estes exames foram feitos com o uso de tiras reativas que demonstram sensibilidade de 97,87% e especificidade de 100%. As tiras reativas possuem a finalidade de determinação rápida de pH, proteínas, glicose, densidade, leucócitos, nitrito e hemácias. Além das tiras reativas, foi realizado o exame de sedimento urinário, o mesmo apresenta sensibilidade de 88,29% e especificidade de 99,16%, utilizado na detecção de macrohematúria (Sánchez-Villalobos et al., 2006). Além disso, os testes de urinálise foram utilizados para uma possível detecção de proteinúria (Falbo et al., 2005; Favarato et al., 2011).

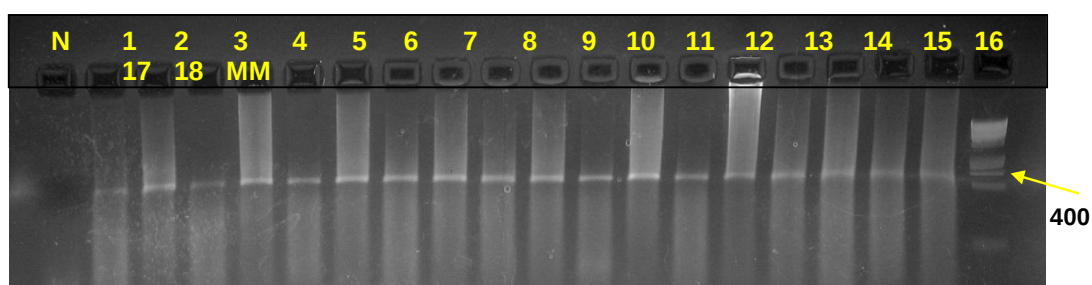
A urinálise completa foi realizada seguindo a técnica de Addis, citada por Levinson e Mcfate (1969) e Vallada (1981). As amostras com 10ml de urina foram submetidas ao exame físico que foi constituído pela determinação do volume, cor, aspecto, odor e a densidade. O exame químico (proteína, acetona, glicose, pigmentos biliares, sais biliares, urobilinogênio, hemoglobina), realizado através de tiras reagentes (URIACTION 10). Para as análises do sedimento urinário as amostras foram centrifugadas a 1800 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos, em seguida desprezou-se o sobrenadante (9ml), restando 1ml de urina mais o sedimento. Realizou-se a homogeneização e o preenchimento da câmara de Neubauer iniciando-se a contagem de hemácias e leucócitos no quadrante central da câmara, com a objetiva de 40.

5 RESULTADOS

5.1 DETECÇÃO GERAL DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO

As PCRs de detecção no sangue e urina dos animais com *primers* degenerados MY11 e MY09 demonstraram que, dos 16 animais analisados, todos foram positivos para MY (400 pb), como mostra a figura 14.

Figura 14 - Gel representativo da PCR de MY para detecção dos Papilomavirus. Poço N: Controle negativo da reação; poço 1-9 (amostras de sangue); 10-18(amostras de urina): Amostras de DNA de sangue e urina de bovino extraídas; poço MM: Marcador molecular de 1kb.

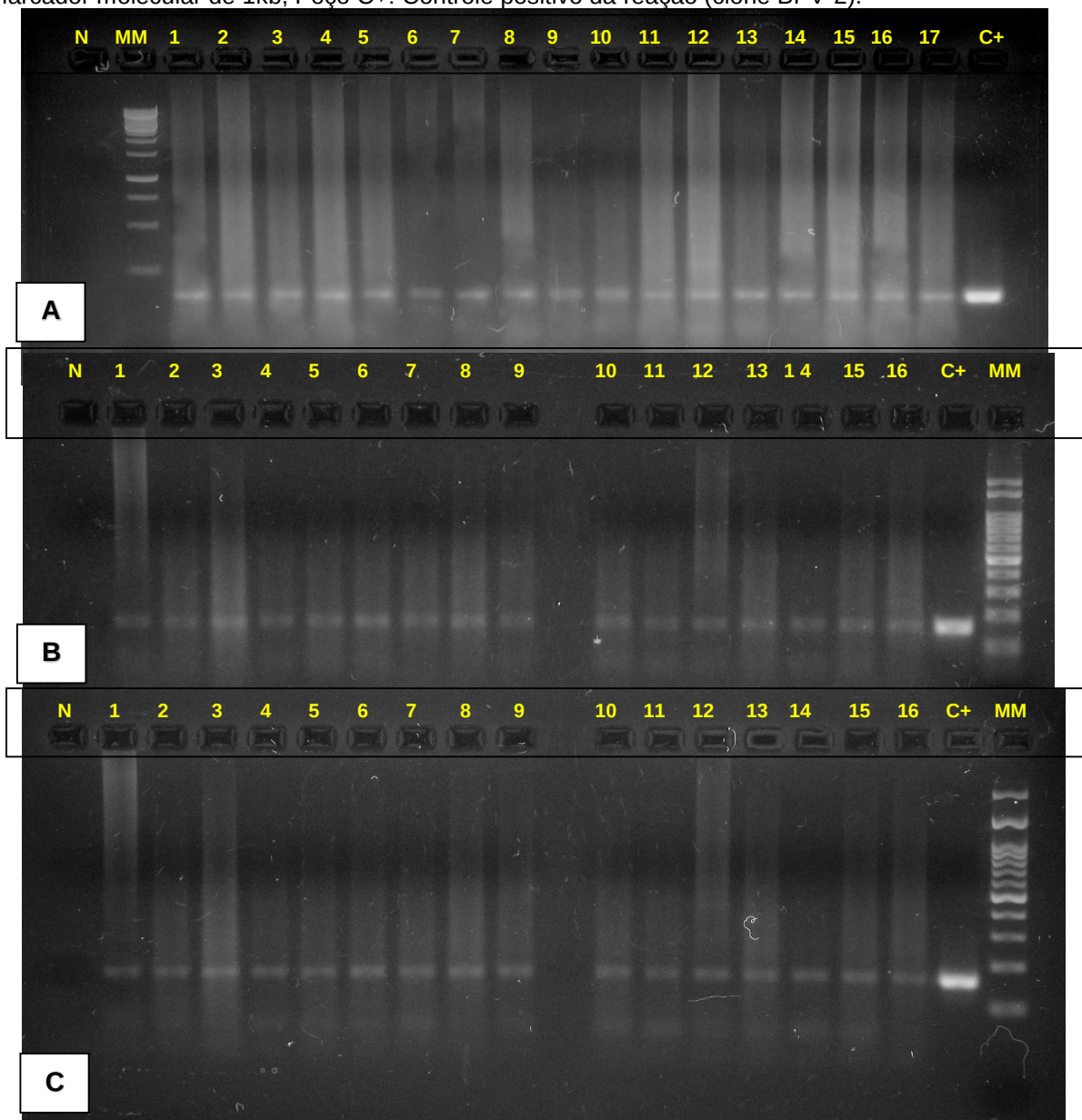


Fonte: Tibúrcio Júnior (2017)

5.2 GENOTIPAGEM PARA BPV-2

Todas as amostras de DNA de sangue foram amplificadas no tamanho esperado (164 pb), sendo todas positivas para BPV-2. Na primeira coleta, 100% dos animais analisados (16/16), através da PCR, foram positivos para BPV-2 (Figura 15). Foram realizadas três coletas de sangue e urina, essas coletas eram realizadas em um intervalo de tempo de quatro meses, durante o período de um ano. A primeira coleta foi realizada 5 meses após a triagem (escolha dos animais para o estudo). Nas três coletas de sangue realizadas, houve uma detecção de BPV-2 em 100% das amostras.

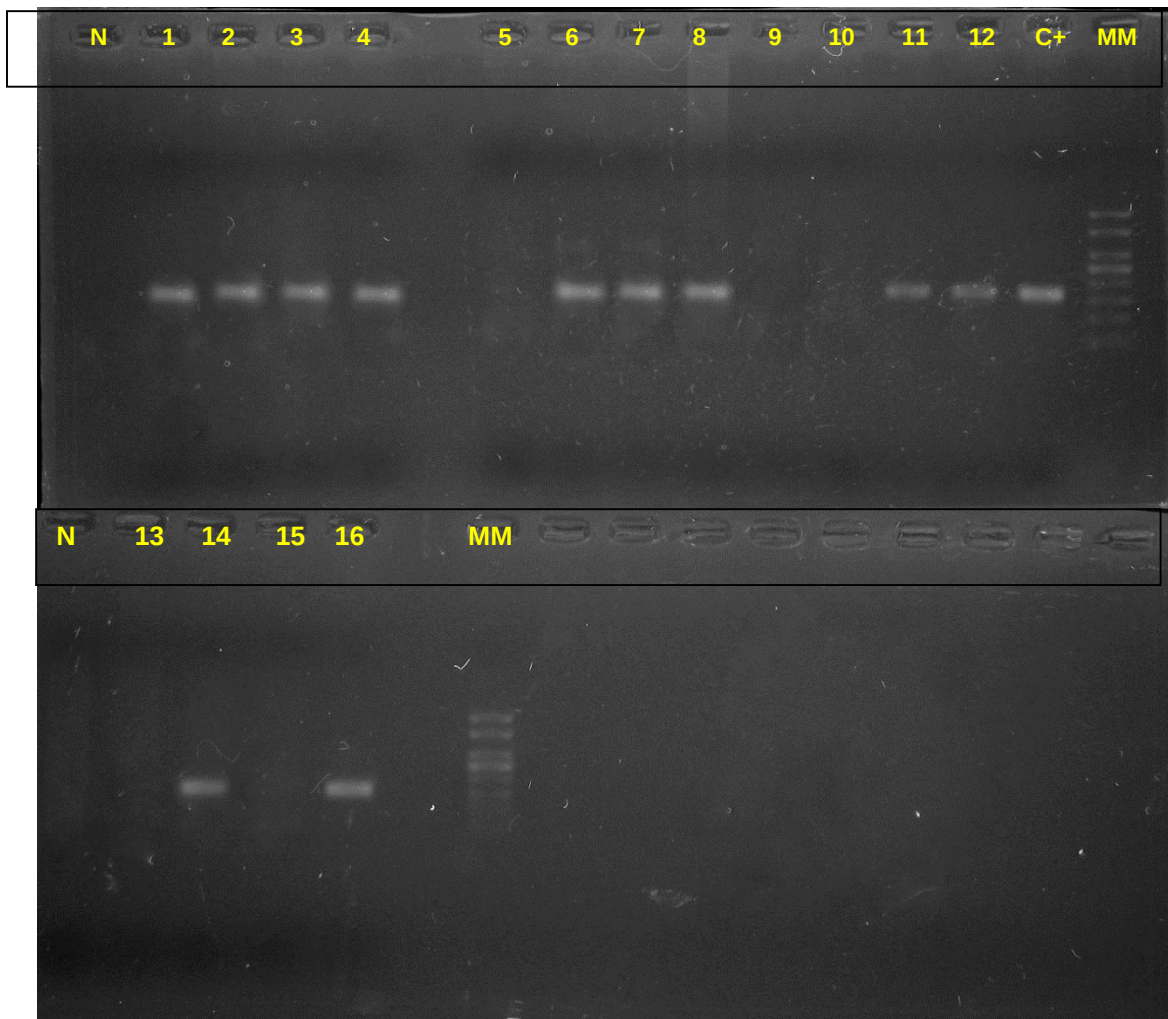
Figura 15 - Gel representativo da PCR de BPV-2 no sangue (A- 1ª coleta, B- 2ª coleta, C- 3ª coleta). Poço N: Controle negativo da reação; poço 1-17: Amostras de DNA de sangue Bovino extraídas; poço MM: Marcador molecular de 1kb, Poço C+: Controle positivo da reação (clone BPV-2).



Fonte: Tibúrcio Júnior (2017)

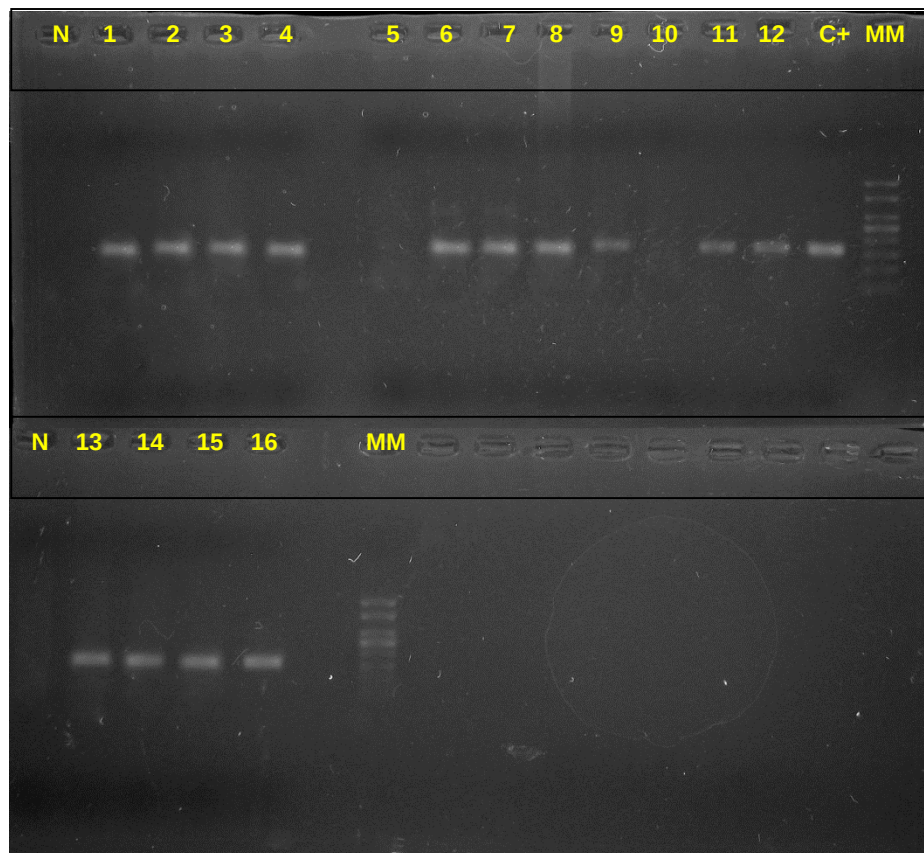
Entretanto, na detecção de BPV-2 em urina, na primeira coleta 68,75 % (11/16) dos animais foram positivos para o vírus, na segunda e terceira 87,5 % (14/16) dos animais se mostraram positivos para o BPV-2.

Figura 16. Gel representativo da PCR de BPV-2. Poço N: Controle negativo da reação; poço 1-12 e 13-16: Amostras de DNA de urina de bovino extraídas (primeira coleta); poço MM: Marcador molecular de 50pb, Poço C+: Controle positivo da reação (clone BPV-2).



Fonte: Tibúrcio Júnior (2017).

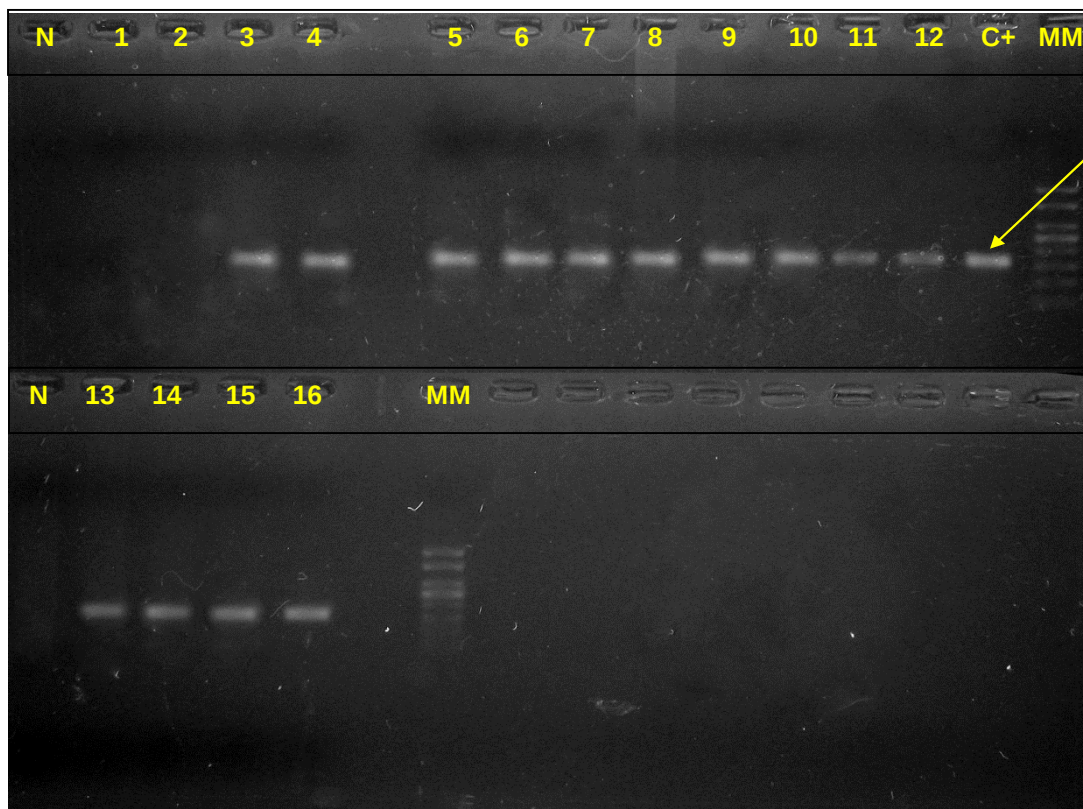
Figura 17 - Gel representativo da PCR de BPV-2. Poço N: Controle negativo da reação; poço 1-12 e 13-16: Amostras de DNA de urina de bovino extraídas (segunda coleta); poço MM: Marcador molecular de 50pb, Poço C+ (164 pb): Controle positivo da reação (clone BPV-2).



Fonte: Tubúrcio Junior (2017).

Na tipificação para BPV-2 em amostras de urina, 87% (14/16) animais foram positivos para a presença do DNA do vírus.

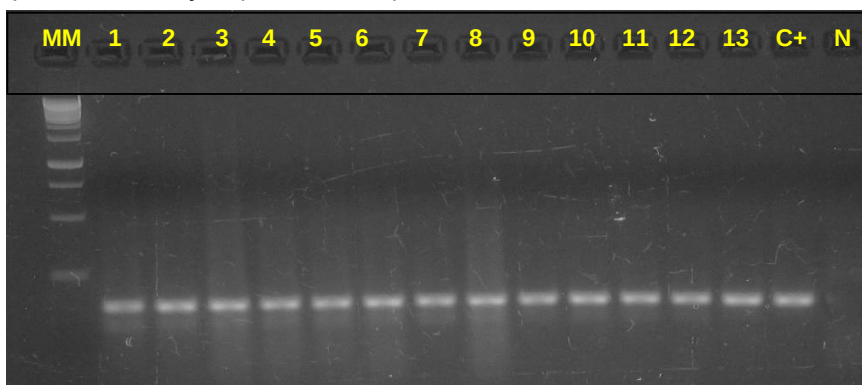
Figura 18 - Gel representativo da PCR de BPV-2. Poço N: Controle negativo da reação; poço 1-12 e 13-16: Amostras de DNA de urina de bovino extraídas (terceira coleta); poço MM: Marcador molecular de 50pb, Poço C+: Controle positivo da reação (164 pb) (clone BPV-2).



Fonte: Tibúrcio Júnior (2017).

Na tipificação de DNA de BPV-2 em lesões, 100% (13/13) dos animais se mostraram positivos para o vírus (Figura 19).

Figura 19 - Gel representativo da PCR de BPV-2. Poço N: Controle negativo da reação; poço 1-12: Amostras de DNA de lesões de bovino extraídas; poço MM: Marcador molecular de 1kb, Poço C+: Controle positivo da reação (clone BPV-2).



Fonte: Pessoa Júnior (2017)

Os resultados da detecção de BPV-2 em sangue, urina e lesão estão reunidos na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados das detecções de BPV-2, nas três coletas de sangue, urina e lesão dos animais.
* Primeira coleta realizada 5 meses após a seleção dos animais para o estudo; ** coleta realizada 4 meses após a primeira coleta; *** coleta realizada 4 meses após a segunda coleta.

AMOSTRAS	BPV-2 (SANGUE) 1ªcoleta*	BPV-2 (SANGUE) 2ªcoleta**	BPV-2 (SANGUE) 3ªcoleta***	ANIMAIS COM OU SEM LESÃO	BPV-2 (URINA) 1ªcoleta*	BPV-2 (URINA) 2ªcoleta**	BPV-2 (URINA) 3ªcoleta***
01	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Neg (-)	Pos (+)	Pos (+)
02	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
03	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)
04	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)
05	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)
06	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Neg (-)	Pos (+)	Pos (+)
07	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)
08	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)
09	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	S/LESÃO	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)
10	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Neg (-)	Pos (+)	Pos (+)
11	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)
12	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	S/LESÃO	Neg (-)	Neg (-)	Neg (-)
13	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)
14	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	S/LESÃO	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)
15	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)
16	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)	C/LESÃO	Pos (+)	Pos (+)	Pos (+)

Fonte: Tibúrcio Júnior (2017).

5.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A média dos valores das análises de uréia e creatinina encontram-se dentro da normalidade segundo Kaneko et al., (1997). Para uréia e creatinina os valores de referência são: 23-58 mg/dL e 1-2 mg/dL respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Média de resultados das análises bioquímicas de sangue (trimestrais) de Uréia (método enzimático-colorimétrico) e Creatinina (método colorimétrico) durante o ano de 2016 e suas respectivas médias gerais e desvio padrão de bovinos adultos, fêmeas da raça Girolando 5/8 da cidade de Itambé-PE.

Animal	Uréia (Média)	Creatinina (Média)
1	28,6	1,2
2	32,0	1,7
3	35,0	1,4
4	31,6	2,0
5	30,6	1,4
6	30,3	1,6
7	34,0	1,4
8	31,3	1,3
9	32,0	1,3
10	35,6	1,2
11	29,6	1,3
12	35,6	1,3
13	28,3	1,7
14	31,6	1,4
15	30,3	1,4
16	35,0	1,1
Média Geral	31,9	1,4
Total Desvio padrão	± 2,41	±0,23

Fonte: Tibúrcio Júnior (2017)

5.4 URINÁLISE

As análises químicas das amostras de urina (Tabela 3), realizadas através de tiras reagentes, não demonstraram proteinúria, não foi detectada a presença de hemácias nas tiras reativas e nas amostras de urina analisadas no microscópio. A cor e aspecto também se mostraram dentro da normalidade.

Tabela 3 - Média dos exames visuais, químicos e microscópicos da urina de bovinos adultos fêmeas da raça Girolando 5/8 da cidade de Itambé-PE. Obs: Proteína: (+) 30mg/dl; (++) 100mg/dl; (+++) 500mg/dl. Hemoglobina: (+) 10mg/dl; (++) 50mg/dl; (+++) 250 mg/dl. Cor: 1= amarelo claro; 2= amarelo escuro; 3= âmbar; 4= vermelho. Aspecto: 1= límpido; 2= ligeiramente turvo; 3= turvo.

MÉDIA DAS VARIÁVEIS									
AMOSTRAS	Ph	Proteína (mg/dl)	Glicose (mg/dl)	Nitrito	Cor	Aspecto	Densidade	Leucócitos (x10 ³ /ml)	Hemácias (x10 ³ /ml)
01	8,5	0	0	0	1	1	1.005	0	0
02	8,5	0	0	0	1	1	1.005	0	0
03	8,5	0	0	0	1	1	1.010	0	0
04	9,0	0	0	0	2	1	1.005	0	0
05	8,5	+	0	0	1	2	1.005	0	0
06	9,0	0	0	0	2	1	1.010	0	0
07	8,0	0	0	0	2	2	1.005	0	0
08	8,5	0	0	0	2	2	1.005	0	0
09	8,5	0	0	0	1	1	1.000	0	0
10	9,0	0	0	0	2	1	1.005	0	0
11	9,0	+	0	0	2	1	1.010	0	0
12	9,0	+	0	0	2	1	1.000	0	0
13	9,0	0	0	0	1	1	1.005	0	0
14	9,0	0	0	0	1	1	1.005	0	0
15	9,0	+	0	0	2	1	1.010	0	0
16	9,0	+	0	0	1	2	1.010	0	0

Fonte: Tibúrcio Júnior (2017).

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, nós avaliamos a presença do Papilomavírus bovino tipo 2, por PCR utilizando primers específicos, em sangue de bovinos da raça Girolando 5/8, fêmeas, entre 2-5 anos de idade, apresentando ou não lesões cutâneas. Todos os animais do trabalho estavam entre a média comum de idade para o desenvolvimento da HEB, entre 2-5 anos de idade. Além do fator idade, neste trabalho, todos os animais foram avaliados quanto às condições físicas, como peso e também análise do histórico de compra e venda, utilizados para o rastreamento antes de serem utilizados no trabalho. Todos os animais se mostraram saudáveis, nenhum dos animais escolhidos apresentou qualquer sintoma de HEB, dado um período de tempo de pelo menos seis meses antes da primeira coleta e seis meses após a última coleta. Estes dados de avaliação física servem para eliminar falso-positivos ou falso-negativos do estudo.

Foi observado a presença do DNA viral em 100% (16/16) dos animais do estudo. Essa alta prevalência de BPV-2 em animais da região de Pernambuco, está de acordo com os resultados de Junior-Pessoa (2016) em um estudo realizado na mesma região.

Apesar do vírus ser descrito como epiteliotrópico, neste trabalho, foi realizada a detecção do BPV no sangue e urina. Esses resultados corroboram com achados de outros estudos, nos quais o DNA de BPV já foi detectado em diferentes sítios, como o sêmen (Silva et al., 2011, 2013), sangue periférico, leite, plasma e colostro (Stocco dos Santos et al., 1998). Esses estudos têm reforçado a ideia de que a presença do vírus na corrente sanguínea facilita a infecção do BPV (Roperto et al., 2011), tornando-se uma via de transporte do vírus para tecidos não epiteliais (Freitas et al., 2007; Santos et al., 2013).

Nós também realizamos a detecção do BPV-2, por meio de PCR, na urina dos bovinos. A prevalência do DNA de BPV-2 foi de 87,5% (14/16) das amostras de analisadas. Um estudo realizado por Pathania et al., (2012) avaliando a presença de BPV-2, constatou a presença do DNA viral em 50% das amostras de urina dos animais com ou sem lesões em áreas endêmicas de HEB. Esses achados corroboram com nossos resultados, mostrando a alta prevalência do vírus tipo 2 e sua presença em sítios não epiteliais, sugerindo que o vírus circule por todo o corpo do animal, possivelmente através da via sanguínea chegando até a bexiga ou outros sítios de infecção. Apesar do vírus estar presente na bexiga desses animais, o vírus provavelmente encontra-se na forma latente na bexiga, e apenas após a ingestão da

samambaia e da atividade dos componentes presentes na planta, com destaque para o Ptaquilosídeo, o vírus seja ativado. Após esta ativação, o vírus atua sinergicamente com os componentes de efeito clastogênico da samambaia acarretando nos sintomas clínicos da hematúria enzoótica e desenvolvimento da neoplasia da bexiga destes animais. Quatro dos 13 animais com lesões foram negativos para BPV-2 na urina na primeira coleta, no entanto, a partir da segunda coleta, apenas um animal continuou negativo na urina dos animais com lesões. Isto é um indício de que o vírus possa ter circulado através do sangue até chegar na bexiga destes animais. Apenas um animal sem lesão foi negativo para a detecção de BPV-2 na urina, permanecendo assim durante as três coletas.

Os resultados das análises bioquímicas de ureia e creatinina dos 16 animais do estudo foram realizadas para a avaliação da função renal. Os resultados das análises de ureia se mostraram dentro dos valores de referência em 100% das amostras. Este valor, segundo Kaneko (2008), é de 23-58 mg/dL em bovinos. Entretanto, em animais afetados pela HEB os resultados das análises de ureia encontram-se acima dos valores de referência, evidenciando uma deficiência da função renal.

Segundo Kaneko (2008), os valores de referência para creatinina plasmática são de 1-2 mg/dL. Em nosso estudo a média apresentada para creatinina foi de A 1,4 mg/dL, ou seja, resultados dentro da normalidade em 100% dos animais avaliados. Estes resultados atestam o funcionamento normal do sistema urinário dos animais do estudo.

A urinálise realizada neste estudo foi dividida em três etapas, devido a sua grande importância no diagnóstico da HEB, isso se deve ao fato de que, os primeiros sintomas da doença podem ser observados através da presença de sangue na urina. Além disso, a detecção de sangue oculto também é realizada através de uma das etapas do teste de urinálise. A análise inicial da coloração da urina se mostrou dentro da normalidade em 100% das amostras analisadas. Esta análise do grau de coloração é a primeira etapa da urinálise e é utilizada para a visualização macroscópica do sangue. Em animais afetados por HEB, em determinados níveis da doença, é possível visualizar o sangue na urina a olho nu. Os resultados desta 58 análise confirmam que os animais não apresentaram nenhum sinal clínico crônico da doença, sinais estes bem característicos da HEB.

A segunda etapa, foi realizada através da análise dos sedimentos da urina, não foi detectado nenhum sinal da presença de hemácias na urina. Estes resultados

demonstram que não houve perda de sangue, diferentemente do que ocorre em animais afetados pela HEB, quando há hemorragias causadas pela hematúria intermitente. Esses dados divergem dos encontrados por Galvão et al., (2012), que detectou a presença de hemácias na urina dos animais do estudo, sendo essa detecção evidenciada através da coloração anormal da urina. Em seu trabalho, podem ser observados os diferentes graus de hematúria de acordo com a coloração da urina.

As categorias como, presença de proteínas, nitrito, densidade, presença de leucócitos e de hemácias foram avaliadas no estudo através das tiras reagentes. As tiras reagentes foram utilizadas devido ao seu alto grau de sensibilidade e especificidade da técnica. Foi detectada a presença de proteína na urina dos animais, no entanto, a quantidade encontrada é aceitável, estando dentro dos padrões de normalidade. Estes resultados podem ser comparados ao trabalho de Falbo et al., (2005), que demonstraram uma moderada proteinúria em animais que apresentavam tanto micro como macrohematúria. Não foi encontrado nitrito em nenhuma das amostras nas três coletas realizadas, e a densidade variou entre 1.005 e 1.020. Estes resultados encontram-se dentro da normalidade. Também não foi detectada a presença de leucócitos, nem de hemácias em 100% das amostras, durante as três coletas realizadas.

As tiras reagentes são utilizadas principalmente na detecção de sangue oculto, sendo este teste de suma importância no que se diz respeito ao diagnóstico da HEB, quando existem apenas quadros de microhematúria, uma vez que, a presença de sangue na urina, durante quadros de microhematúria, são detectados unicamente por meio das tiras reagentes, devido ao seu alto grau de sensibilidade e especificidade. Falbo et al., (2005) detectou a presença de sangue oculto em animais com quadros de microhematúria, no nosso trabalho não foi detectada a presença de sangue nas amostras, o que está de acordo com os outros testes para detecção de sangue na urina realizados no nosso estudo. Desta forma, o conjunto de resultados obtidos através das três técnicas de urinálise aplicadas neste estudo, demonstram que os animais não apresentaram nenhum sinal clínico da HEB, 59 durante o período de um ano.

Existe uma grande lacuna na literatura de trabalhos que tenham realizado testes bioquímicos e de urinálise na pesquisa de HEB. A maioria dos trabalhos realizaram apenas a análise dos tecidos da bexiga urinária dos animais que foram levados para o abate, sendo realizada apenas a pesquisa do vírus na urina (Borzacchiello et al., 2003; Peixoto et al., 2003; Carvalho et al., 2006; Gabriel et al., 2009; Cota et al., 2015). Dessa

forma não tivemos um bom número de trabalhos para realizar a comparação dos resultados de bioquímica e urinálise do nosso trabalho com o de outros autores.

Cota et al., (2015) avaliou a presença de BPV-2 em animais acometidos pela HEB, onde num total de 38 animais afetados pela HEB, 27 (71%) estavam contaminados pelo BPV-2. O nosso estudo difere do estudo de Cota et al., (2015) porque avaliamos os animais durante o período de um ano, além disso avaliamos a presença do BPV-2 em animais não afetados pela HEB. Outro fator importante foi que os critérios de avaliação realizados no estudo de Cota et al., (2015) foram apenas a detecção viral e avaliação da presença do vírus em diferentes lesões de animais abatidos.

Diversos estudos estudaram a presença do BPV-2 em lesões neoplásicas em animais de regiões endêmicas para a HEB (Borzacchiello et al., 2003; Wosiacki et al., 2005, Balcos et al., 2008, Resendes et al., 2011; Pathania et al., 2012; Cota et al., 2015), no entanto, esses estudos, diferem do nosso porque avaliaram apenas a presença do BPV-2. Todos estes estudos avaliaram animais de regiões endêmicas e que faziam ou fizeram consumo da samambaia em algum momento, e além disso o material estudado foi a bexiga urinária destes animais para avaliação da presença ou não de lesões características da HEB. No nosso trabalho realizamos a avaliação da presença do BPV-2 em três diferentes tipos de amostras (sangue, urina e lesões de pele) e realizamos o acompanhamento dos animais durante um longo período de tempo (13 meses) em animais que nunca tiveram contato algum com a samambaia.

Os nossos resultados sugerem que, a infecção pelo BPV-2 em animais que não fazem o consumo de samambaia, não é suficiente para causar os sinais clínicos da hematúria enzoótica bovina e consequente desenvolvimento do câncer de bexiga. Estes resultados diferem dos resultados de Stocco dos Santos et al., (1998), que em seu trabalho afirmou que o BPV-2, per si, era capaz de causar fragilidade cromossômica e consequente desenvolvimento dos sinais clínicos da hematúria 60 enzoótica e câncer de bexiga. No entanto, são claras as limitações do trabalho de Stocco dos Santos et al., (1998). Os animais doadores foram expostos ao consumo de samambaia em pastagens e foram afetados por hematúria crônica. Apesar destes animais doadores terem sido mantidos livres do consumo de samambaia, durante 36 meses antes do início do trabalho, os mesmos podem ter sofrido alterações cromossômicas antes mesmo do início da pesquisa. No nosso trabalho, selecionamos animais de uma região ausente de samambaia nas pastagens, todos os animais do

trabalho não tiveram nenhum contato com a samambaia ou sequer histórico de hematúria enzoótica bovina, o que aumenta a segurança dos nossos resultados.

A via de inoculação escolhida por Stocco dos Santos et al., (1998) não é uma via de infecção pelo vírus, tendo o vírus sido inoculado através da via intramuscular. Os animais são infectados naturalmente pelo vírus, essa infecção ocorre inicialmente através da camada basal, por meio de microlesões na pele ou mucosas. O BPV pode ser contraído através de inoculação cutânea por contato direto, contato indireto por meio de fômites (cercas, bebedouros, cordas, moscas, ordenhadeira), ou pela via transplacentária.

Além da via de inoculação, outro fator importante e limitante do trabalho de Stocco dos Santos et al., (1998) foi a quantidade de vírus inoculada. No presente trabalho nós selecionamos animais infectados naturalmente pelo vírus, o que torna o estudo mais confiável em relação com a forma como o vírus infectou o animal e quantidade do vírus presente. A grande quantidade do vírus inoculada por Stocco dos Santos et al., (1998) pode ter tido influência nos resultados de aberrações cromossômicas, o vírus pode ter potencial clastogênico, porém esse potencial não seria suficiente para desencadear a hematúria enzoótica ou desenvolvimento de neoplasias da bexiga, nos bovinos. Ou seja, essa quantidade pode ter tido interferência direta nos resultados, levantando resultados falso-positivos.

Todos os resultados obtidos neste trabalho foram analisados durante um período de tempo suficiente para cobrir o aparecimento dos sintomas da HEB, incluindo também períodos de remissão da doença, período onde os sintomas não aparecem. Os animais foram avaliados quanto a presença do BPV-2 no sangue, urina e lesões. Também foi realizada a avaliação da função renal, análises físicas dos animais e análises física e química da urina. As análises física e química da urina eram capazes de detectar a presença de sangue nas duas fases das HEB, 61 detectando tanto a micro quanto a macro hematúria.

Desta forma, através dos resultados obtidos é possível observar que, apenas a infecção pelo BPV-2 não é capaz de desencadear a hematúria enzoótica bovina, sugerindo-se que, o desenvolvimento da HEB seja dependente do sinergismo entre os componentes tóxicos da samambaia, que possuem potencial clastogênico, mais a presença de componentes imunossupressores ativem a infecção pelo BPV-2. O vírus, que estaria presente na bexiga urinária desses animais que fazem a ingestão de samambaia, logo após a ingestão da planta, seria ativado, inativando genes

supressores tumorais e de reparo. Isto acarretaria no desenvolvimento da HEB e câncer da bexiga desses animais. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliarem o papel do BPV e da samambaia no desenvolvimento da HEB.

7 CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram a detecção do BPV-2 no sangue e urina dos animais do estudo e que se encontravam em uma propriedade não endêmica não havendo qualquer tipo de ingestão de samambaia por estes animais, demonstrando a presença do vírus em outros tecidos. Os resultados das análises bioquímicas se mostraram dentro da normalidade, demonstrando a funcionalidade normal da função renal, além dos resultados das análises de urina, que não detectou nenhum sinal de HEB em nenhuma das fases da doença, o que confirma a confiabilidade dos testes.

A relação dos resultados se mostraram coerentes, confirmando o não desenvolvimento da HEB nos animais do estudo. Desta forma, sugere-se que, a infecção pelo BPV-2 per si, não é suficiente para o desenvolvimento da Hematúria enzoótica bovina e câncer de bexiga.

REFERÊNCIAS

- APARECIDA DA SILVA, M., et al. Prevalence of bovine enzootic haematuria in dairy cattle in the Caparaó microregion, Southern Espírito Santo, between 2007 and 2008. **Ciencia Rural**. Santa Maria 39:1847–1850. 2009.
- ARALDI, R.P., et al. Bovine papillomavirus isolation by ultracentrifugation. **J Virol Methods**. 208: 119-124; 2014.
- ARALDI, R.P., et al. Papillomaviruses: a systematic review. **Genetics and Molecular Biology Online Ahead of Print**. 2016.
- BALCOS, L. G. F., et al. Association of bovine papillomavirus type-2 and urinary bladder tumours in cattle from Romania. **Research in Veterinary Science**. 85. 145–148. 2008.
- BATISTA, M.V.A., et al. Molecular epidemiology of bovine papillomatosis and the identification of a putative new virus type in Brazilian cattle. **The Veterinary Journal**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.01.019>. 2013.
- BERNARD, H. U., et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**. 401, 70–79. 2010.
- BETIOL, J. C., et al. Bovine Papillomavirus: New Insights into an Old Disease. **Blackwell Verlag GmbH Transboundary and Emerging Diseases**. 2014.
- BORZACCHIELLO, G AND ROPERTO F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Vet. Res.** 39:45. 2008.
- BORZACCHIELLO, G. Bovine papillomavirus infections in animals. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. A. Méndez –Vilas (Ed.) 2007.
- BORZACCHIELO, 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**. 84, 2921–2926. 2003.
- CAMPO, M. S., et al. Association of Bovine Papillomavirus Type 2 and Bracken Fern with Bladder Cancer in Cattle. **Cancer Res.** 52:6898-6904. 1992.
- CAMPO, M.S. Bovine papillomavirus: old system, new lessons? Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond, **Caister Academic Press, Scotland**. 373-383. 2006.
- CAMPO, M.S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. **Virus Res.** 89: 249- 261. 2002.
- CAMPO, M.S. Infection by bovine papillomavirus and prospects for vaccination. **Trends Microbiol.** 3: 92-97. 1995.

CAMPO, M.S. Review bovine papillomavirus and cancer. **Vet J.** 154: 175-188. 1997.

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.** 59 (2012) 441– 447. 2012.

CARVALHO, T; PINTO, C; PELETEIRO M.C. Urinary Bladder Lesions in Bovine Enzootic Haematuria. **J. Comp. Path.**Vol.134, 336-346. 2006.

COTA, J.; PELETEIRO, M.; PETTI, L.; TAVARES, L.; DUARTE, A. Detection and quantification of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladders and lymph nodes in cases of bovine enzootic hematuria from the endemic region of Azores. **Vet Microbiol.** 178:138-143. 2015.

DA SILVA, F.R.C., et al. Novel Bovine Papillomavirus Type Discovered by Rolling-Circle Amplification Coupled with Next- Generation Sequencing. **PLOS ONE.** DOI:10.1371/journal.pone.0162345 September 8. 2016.

FALBO, M.K., et al. Alterações hematológicas, bioquímicas, urinárias e histopatológicas na intoxicação natural em bovinos pela samambaia *Pteridium aquilinum* (L.) Kühn. Hematological, biochemical, Urinary and histopathological changes in natural intoxication in bovine by bracken fern (*Pteridium aquilinum*) (L.) Kühn. **Ciências Agrárias.** Londrina, v. 26, n. 4, p. 547-558, out./dez. 2005.

FENWICK, G.R. Bracken (*Pteridium aquilinum*) -Toxic Effects and Toxic Constituents. **J Sci Food Agric.** 1988,46, 147-173. 1988.

FOZ FILHO, R.P.P.; LUCAS, R.; MAIORKA, P.C.; YOSHINO, M.L. Retirada cirúrgica de fibropapiloma eqüino por meio de criocirurgia. In: V Congresso Brasileiro de Medicina e Anestesiologia Veterinária. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias.** 9 (1): 282-283. 2002.

FREITAS, A. C., et al. Papillomavirus DNA detection in non-epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus, in Mendez-Villas, A. (Eds.), **Communicating Current research and educational Topics and Trends in Applied Microbiology.** 1: 697-704. 2007.

FREITAS, A. C., et al. Recent insights into Bovine Papillomavirus. **African Journal of Microbiology Research.** Vol. 5(33), pp. 6004-6012, 31 December. 2011.

FREITAS, A.C., et al. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. **Braz. J. Microbiol.** 34:76–78. 2003.

FURLAN, F.H., et al. Intoxicação aguda por *Pteridium arachnoideum* e *Pteridium caudatum* em bovinos e distribuição das plantas em Mato Grosso. **Pesq. Vet. Bras.** 34(4):343-348, abril. 2014.

GABRIEL, A.L., et al. Aspectos clínico- hematológicos e lesões vesicais na intoxicação crônica espontânea por *Pteridium aquilinum* em bovinos. Clinical and hematological

aspects and urinary bladder lesions in chronic spontaneous poisoning by *Pteridium aquilinum* in cattle. **Pesq. Vet. Bras.** vol.29 no.7 Rio de Janeiro July. 2009.

GALVÃO, A, et al. Sobrevivência/viabilidade de bovinos com Hematúria Enzoótica após transferência para região livre de *Pteridium arachnoideum*. **Pesq. Vet. Bras.** 32(9):887-902, 887 setembro 2012.

GRUBER, M. Papilomatose, <http://www.bichoonline.com.br>. 2002.

HAMA, C.; MATSUMOTO, T.; FRANCESCHINI, P.H. Papilomatose bovina: avaliação clínica de diferentes produtos usados no controle e tratamento. **Ciência Veterinária.** 2 (2):14-15.1988.

HATAMA, S.; NOBUMOTO, K.; KANNO, T. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. **J Gen Virol.** 89, 158-163. 2012.

JARRETT, W. F.H., et al. High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papilloma virus. **Nature.** London, v.274, p.215-217. 1978.

JESUS, A.L.S. Produção da proteína L1 do Papilomavírus bovino tipo 1 em *Pichia pastoris*. **Dissertação de Mestrado em Genética da Universidade Federal de Pernambuco.** 2008.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. 5th ed. New York: **Academic Press.** 1997.

KANEKO, J.J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals.** 2008.

LANCELLOTTI, C.L.P., et al. Diagnóstico laboratorial. Consenso Brasileiro de HPV, 1999, São Roque. São Paulo: **BG Cultural.** p.45-60. 2000.

LEAL, A., et al. Quercetin induces structural chromosomal aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4. **Vet Comp Oncol.** 1:15- 21. 2003.

MARÇAL, W. S., et al. Intoxicação aguda pela samambaia (*Pteridium aquilinum*, L. Kuhn), em bovinos da raça Abbeerden angus. **Archives of Veterinary Science.** Curitiba, v.7, n.1, p.77-81. 2001.

MARÇAL, W.S. A intoxicação por samambaia em bovinos criados no Estado do Paraná Bracken fern poisoning to cattle raised in Parana State, Brazil. Semina: **Ciências Agrárias.** Londrina, v. 24, n. 1, p. 197-208, jan./jun. 2003.

MARÇAL, W.S. **A toxidez da samambaia nos bovinos.** Disponível em:<<http://www.saudeanimal.com.br/bovino-samambaia.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2017. 2000.

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

Espírito Santo. Campos dos Goyatacazes-RJ. **Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goyatacazes.** 2004.

MARRERO, E., et al. Chronic Toxicity in Cattle due to *Pteridium aquilinum* (Bracken Fern) in Tarija Department, Bolivia: an. Interdisciplinary Investigation. Chapter 36. In Acamovic T, Stewart CS, Pennycott TW (eds) *Poisonous Plants and related toxins.* **CABI Publishing.** Wallingford, pp 248-252. 2004.

MOLNJ, A.; KLETER, B.; QUINT, W.I.M.; VAN DOORN, L.J. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology.** 32S S43–S51. 2005.

MONTEIRO, V.L.C., et al. Descrição clínica e histopatológica da papilomatose cutânea bovina (BPV). **Ciência Animal Brasileira.** 2008;9(4):1079-88. 2008.

MUNDAY, J.S., et al. Genomic Characterisation of the feline sarcoid-associated papillomavirus and proposed classification as *bos Taurus* papillomavirus type 14. **Veterinary Microbiology.** 0378-1135. 2015.

MURPHY, F.A., et al. Poxviridae. **Veterinary Virology Academic Press.** 277-291. 1999.

OGAWA, T., et al. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. **J. Gen. Virol.** 85:2191-2197. 2004.

OLIVEIRA, L.G.P. Novos aspectos patológicos e patogenéticos da hematúria enzoótica bovina. 2009. 132f. Dissertação (Mestrado em Ciências Clínicas e Patológicas) – **Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.** 2009.

ONIONS, D. Papillomaviruses: progress for human and veterinary medicine. **Vet. J.** 154, 171–172.1997.

PATHANIA, S., et al. Detection and Quantification of Bovine Papilloma Virus Type 2 (BPV-2) by Real-time PCR in Urine and Urinary Bladder Lesions in Enzoötic Bovine Haematuria (EBH)-Affected Cows. **Transboundary and Emerging Diseases.** 59, 79–84. 2012.

PEIXOTO, P.V., et al. Histopathological aspects of bovine enzoötic hematuria in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v.23, p.65-81. 2003.

PINTO, C.A., et al. Bovine enzoötic haematuria on Sao Miguel Island. 2004.

RADOSTITS, O.M., et al. **Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats.** 10.ed. Philadelphia: Saunders, p.673-762. 2007.

RECTOR, A.; RANST, V.M. Animal papillomaviruses. **Virology.** Oct;445(1-2):213-23. 2013.

RESENDES, A. R., et al. Association of bovine papillomavirus type 2 (BPV-2) and urinary bladder tumours in cattle from the Azores archipelago. **Research in Veterinary Science**. 90; 526–529. 2011.

RISSI, D.R., et al. Intoxicações por plantas e micotoxinas associadas a plantas em bovinos no Rio Grande do Sul: 461 casos. **Pesq. Vet. Bras**. 27:261-268. 2007.

ROPERTO, S.; MUNDAY, J.; CORRADO, F.; GORIA, M.; ROPERTO, F. Detection of bovine papillomavirus type 14 DNA sequences in urinary bladder tumors in cattle. **Vet Microbiol**. 190:1-4. 2016.

ROPERTO, S., et al. Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: Possible biological role. **J Gen Virol**. 89:3027-3033. 2008.

ROPERTO, S., et al. A Review of Bovine Urothelial Tumours and Tumour-Like Lesions of the Urinary Bladder. **J. Comp. Path**. Vol. 142, 95 e 108. 2011.

ROSENBERGER, G. **Exame Clínico dos Bovinos**. Guanabara Koogan Ed., Rio de Janeiro, 3 ed., 419 p.1993.

SÁNCHEZ-VILLALOBOS, A., et al. Validez, seguridad y cociente de verosimilitud de los métodos tiras reactivas para orina y examen microscópico del sedimento urinario en el diagnóstico de hematuria enzoótica bovina. **Revista Científica, FCV-LUZ**. v.16, n.6, p.604-612. 2006.

SANTOS, E.U.D., et al. Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of Cattle. Blackwell Verlag GmbH **Transboundary and Emerging Diseases**. 2013.

SAVINI, F., et al. Bovine papillomavirus type 7 in Italy: complete genomes and sequence variants. **Virus Genes**. 52:253–260. 2016.

SHARMA, R.; BHAT, T.K.; SHARMA, O.P. The Environmental and Human Effects of Ptaquiloside-Induced Enzootic Bovine Hematuria: A Tumorous Disease of Cattle. D.M. Whitacre (ed.), **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, 224, DOI 10.1007/978-1-4614-5882-1_3, New York. 2012.

SILVA, M.A.R., et al. Detection of bovine papillomavirus type 2 DNA in commercial frozen semen of bulls (*Bostaurus*). **Anim. Reprod. Sci**. 129(3-4):146-151. 2011.

SILVA, M.A.; NUNES, L.C. Hematúria enzoótica bovina, aspectos etiológicos, epidemiológicos, clínicos e histopatológicos. **Coletânea da I Jornada Científica da Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo (1, 2012, Alegre, ES)**. Capítulo 11. 2012.

SINGH, A.K.; JOSHI, H.C.; RAY, S.N. Studies on bovine haematuria. Haematological and biochemical observations on the blood of cattle suffering from haematuria. **Indian J. Anim. Sci**. 43:296-299. 1973.

SINGH, V.; SOMVANSHI, R.; TIWARI, A.K. Papillomatosis in Indian cattle: occurrence and etiopathology. **Indian J. Vet. Pathol.** 33: 52-57. 2009.

SMITH, B.L., et al. Bostock, in *Plant-Associated Toxins: Agricultural, Phytochemical and Ecological Aspects*, ed. S. M. Colegate and P. R. Dorling, **CAB International**. Wallingford, ch. 9, pp. 45–50. 1994.

SMITH, B.L. The toxicity of bracken fern (genus *Pteridium*) to animals and its relevance to man. Handbook of plant and fungal toxicants. **CRC Press**. New York, USA, pp. 63–76. 1997.

SOUTO, M.A.M., et al. Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina. Urinary bladder neoplasms associated with bovine enzootic hematuria. **Ciência Rural**. v.36, n.5, set- out. 2006.

STOCCO DOS SANTOS, R. C., et al. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. **Journal of General Virology**. 79, 2127–2135. 1998.

TOKARNIA, C.H., DOBEREINER, J., PEIXOTO, P.V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Helianthus, Rio de Janeiro. 310p. 2000.

TOKARNIA, C. H., DÖBEREINER, J., CANELLA, C. F. C. Ocorrência da Hematúria Enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. II. Estudos complementares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.4, p.209-224. 1969.

TOMITA, Y.; OGAWA, T.; JIN, Z.; SHIRASAWA, H. Genus specific features of bovine papillomavirus E6, E7, E5 and E8 proteins. **Virus Res**. 124:231-236; 2007.

VAN DER HOEVEN, J.C.M., et al. Aquilide A, a new mutagenic compound isolated from bracken fern (*Pteridium aquilinum*). **Carcinogenesis**. 4: 1587–1590. 1983.

WOSIACKI, S.R., et al. Bovine papillomavirus type 2 detection in the urinary bladder of cattle with chronic enzootic haematuria. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, Vol. 101(6): 635-638, September. 2006.

YAMADA, K., OJIKI, M., KIGOSHI, H. Ptaquiloside, the major toxin of bracken, and related terpene glycosides: chemistry, biology and ecology. 798 | Nat. Prod. Rep., 2007, 24, 798–813. **The Royal Society of Chemistry**. 2007.

ZHENG, Z.M., BAKER, C.C. PAPILLOMAVIRUS GENOME STRUCTURE, EXPRESSION, AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION. **Front Biosci**. 11: 2286–2302. 2006.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from Basic Studies to Clinical Application. **Nature reviews**. 2: 342-350. 2002.

APÊNDICE

Tabela 4. Exame visual, químico e microscópico da urina de bovinos adultos fêmeas da raça Girolando 5/8 da cidade de Itambé-PE.

AMOSTRAS		VARIÁVEL								
AMOSTRAS	pH	Proteína (mg/dl)	Glicose (mg/dl)	Nitrito	Cor	Aspecto	Densidade	Leucócitos (x10³/ml)	Hemácias (x10³/ml)	
1ª COLETA	01	9,0	+	0	0	1	1	1.005	0	+
	02	9,0	+	0	0	1	1	1.005	0	0
	03	9,0	+	0	0	2	2	1.010	0	0
	04	9,0	0	0	0	1	1	1.005	0	0
	05	9,0	+	0	0	2	2	1.005	0	0
	06	9,0	0	0	0	1	1	1.010	0	0
	07	9,0	0	0	0	2	2	1.005	0	0
	08	9,0	+	0	0	2	2	1.005	0	0
	09	9,0	+	0	0	1	1	1.000	0	0
	10	9,0	0	0	0	1	1	1.005	0	0
	11	9,0	+	0	0	2	1	1.010	0	0
	12	9,0	+	0	0	2	1	1.000	0	0
	13	9,0	+	0	0	2	1	1.005	0	0
	14	9,0	0	0	0	1	1	1.005	0	0
	15	9,0	+	0	0	2	1	1.010	0	0
	16	9,0	+	0	0	1	1	1.010	0	0
2ª COLETA	01	8,5	0	0	0	1	1	1.010	0	0
	02	8,0	0	0	0	1	1	1.010	0	0
	03	8,0	0	0	0	1	1	1.010	0	0
	04	9,0	0	0	0	2	1	1.000	0	0
	05	8,5	+	0	0	1	2	1.005	0	0
	06	9,0	0	0	0	1	1	1.020	0	0
	07	8,0	0	0	0	2	2	1.020	0	0

Continuação tabela 4. Exame visual, químico e microscópico da urina de bovinos adultos fêmeas da raça Girolando 5/8 da cidade de Itambé-PE.

	08	7,5	0	0	0	1	2	1.020	0	0
	09	8,5	0	0	0	1	1	1.010	0	0
	10	8,5	+	0	0	2	1	1.000	0	0
	11	8,5	+	0	0	2	1	1.010	0	0
	12	9,0	0	0	0	1	1	1.000	0	0
	13	9,0	0	0	0	1	1	1.010	0	0
	14	9,0	0	0	0	1	1	1.020	0	0
	15	8,5	0	0	0	2	2	1.000	0	0
	16	9,0	0	0	0	2	2	1.000	0	0
3ª COLETA	01	8,5	0	0	0	1	2	1.000	0	0
	02	8,0	0	0	0	1	2	1.020	0	0
	03	8,5	0	0	0	1	1	1.010	0	0
	04	8,0	0	0	0	2	1	1.010	0	0
	05	8,0	0	0	0	1	1	1.005	0	0
	06	8,5	0	0	0	2	2	1.010	0	0
	07	8,0	+	0	0	2	2	1.010	0	0
	08	8,5	0	0	0	2	1	1.010	0	0
	09	8,5	0	0	0	1	2	1.010	0	0
	10	9,0	0	0	0	2	1	1.005	0	0
	11	9,0	+	0	0	2	1	1.010	0	0
	12	8,5	+	0	0	2	1	1.020	0	0
	13	9,0	0	0	0	1	1	1.010	0	0
	14	9,0	0	0	0	1	1	1.000	0	0
	15	9,0	+	0	0	1	1	1.005	0	0
	16	8,0	+	0	0	1	2	1.010	0	0

Obs: Proteína: (+) 30mg/dl; (++) 100mg/dl; (+++) 500mg/dl. Hemoglobina: (+) 10mg/dl; (++) 50mg/dl; (+++) 250 mg/dl. Cor: 1= amarelo claro; 2= amarelo escuro; 3= âmbar; 4= vermelho. Aspecto: 1= límpido; 2= ligeiramente turvo; 3= turvo