



**Estudo citológico, anatomopatológico e molecular do papiloma vírus bovino (bpv)
no trato reprodutivo de vacas**

Talita de Paula Silva Moura

Dissertação apresentada para a obtenção do
título de Mestre em Sanidade, Segurança
Alimentar e Ambiental no Agronegócio.
Área de concentração: Segurança
Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.

SÃO PAULO
2017

INSTITUTO BIOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO

Talita de Paula Silva Moura

**Estudo citológico, anatomopatológico e molecular do papiloma vírus bovino (bpv)
no trato reprodutivo de vacas**

Dissertação apresentada para a obtenção do título
de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e
Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e
Sanidade no Agroecossistema.

Orientador:

Dra. Claudia Del Fava

SÃO PAULO
2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Talita de Paula Silva Moura

Título: Estudo citológico, anatomopatológico e molecular do papiloma vírus bovino (bpv) no trato reprodutivo de vacas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio do Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia do agronegócio, da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Aprovado em: 26 /05/2017

Banca Examinadora

Prof^a. Dra: Claudia Del Fava

Instituição: Instituto Biológico

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dra: Enio Mori

Instituição: Instituto Pasteur

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof^a. Dra: Rosa Maria Piatti

Instituto: Instituto Biológico

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Em memória de Inacia Lucinda Moura da Silva (Tia), Michelle Alexandra da Silva (Prima), Toninho Correiro Lopes (Tio) e Laura Pereira de Moura (Ávo), dedico esse trabalho aos bons momentos que passei com cada um de vocês. Dedico Também a meus Pais, a todos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** e aos meus **Mentores Espirituais**, por mais uma vitória, pela evolução espiritual e intelectual e por nunca me deixar desanimar frente às dificuldades.

A minha mãe **Meire de Silva Moura**, agradeço pelo amor incondicional, pela dedicação e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida e por acreditar em meus sonhos.

Ao meu companheiro **Renato Kumamoto**, agradeço pela parceria, pela amizade, pelo amor que construímos e por me escolher como sua companheira para essa linda jornada.

À minha irmã **Patricia de Paula Silva Moura**, agradeço os incentivos, e o amor, e por me presentear com meus dois amores **Lucas Moura Pestana** e **David Moura Pestana** meus sobrinhos.

À minha orientadora **Dra. Claudia Del Fava**, agradeço pela paciência, a amizade, a compreensão, por acreditar no trabalho, e por me apresentar o universo fascinante da anatomia patologia de animais.

À **Dra. Liria Hiromi Okuda**, agradeço por estar sempre pronta a ajudar, pela colaboração e principalmente por acreditar no trabalho.

À banca examinadora formada pelo **Dr. Enio Mori** e **Dra. Rosa Maria Piatti**, agradeço pela imensa contribuição ao trabalho.

Ao **Carlos Augusto Burjato Filho**, agradeço pela amizade, por acreditar no trabalho e pelas coletas a campo.

Ao **Roberto Tadeu**, a amizade e a contribuição com os periódicos.

Ao **Vitor José Gomes Vieira**, agradeço por sempre estar pronto a ajudar.

À **Dirlene Marques Justino**, agradeço a amizade, por bons momentos juntas e pelo apoio.

À **Vitória Abaz Galero**, agradeço pela amizade e pelo apoio.

Aos funcionários e estudantes do **Instituto Biológico** em especial do **LAP** e **LVB**, do **APC Laboratório** e dos **Frigoríficos** que forneceram as amostras, gostaria de agradecer por ajudarem tanto direta quanto indiretamente para que fosse possível concluir o trabalho.

Agradeço a **CAPES** pela bolsa.

EPÍGRAFE

“A convicção é inimigo mais perigoso da verdade que a própria mentira.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

MOURA, Talita de Paula Silva - **Estudo citológico, anatomopatológico e molecular do papiloma vírus bovino (BPV) no trato reprodutivo de vacas.** São Paulo. 2017. 82 f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2017.

O DNA do papiloma vírus bovino-1 (BPV-1) tem sido constatado em lavado uterino de vacas, evidenciando que o vírus infecta o trato reprodutor feminino, mas estudos necessitam avaliar sua patogenicidade. Investigou-se o BPV e sua associação às lesões no sistema reprodutivo de fêmeas bovinas adultas por meio de diferentes técnicas: macroscopia e histopatologia (coloração hematoxilina e eosina – HE); imunohistoquímica (IHQ) para marcadores oncogênicos p16, Ki-67 e receptor de estrógeno (RE); análise citológica em esfregaço de colo uterino pela técnica Papanicolau; *nested*-PCR para o gene L1 do capsídeo viral do BPV utilizando os *primers* FAP59/ FAP64 e Delta Epsilon F/ Delta Epsilon R. Amostras de tecidos de 80 vacas (ovários, tubas, cornos, corpo e cérvix uterino) e sangue total com anticoagulante (EDTA) foram coletadas em abatedouros no Estado de São Paulo. Os materiais para a análise histopatológica foram fixados em formol 10% tamponado; sangue total e tecidos coletados para *nested*-PCR foram mantidos congelados a -20°C até realização das análises. Foi colhido suabe de colo uterino para estudo citológico em lâminas de vidro e fixados com polietilenoglicol em *spray*. A macroscopia mostrou que em 80 animais 5,0% apresentaram metrite e 5,0% endometrite; na histopatologia (HE) 25,0% das vacas apresentaram endometrite inespecífica. A citologia encontrou atipias em 25% (20/80) amostras: cariomegalia, binucleação e multinucleação. A IHQ e *nested*-PCR foram realizadas a fim de verificar se havia associação entre lesões teciduais e infecção pelo BPV. A *nested*-PCR e a IHQ p-16 foram negativas em todas as amostras. 20 animais com atipia celular (Papanicolau) foram analisadas em HE confirmando a presença de endometrite inespecífica; a IHQ destes materiais utilizando Ki-67 e RE detectou positividade em 17,5% (14/80) para ambos biomarcadores, identificando adenocarcinoma endometrial. Demonstra-se que o estrógeno foi fator de risco para esta neoplasia.

PALAVRAS-CHAVE: Anatomopatologia. IHQ. Marcador de receptor de estrógeno. Ki-67. p-16. *Nested-PCR*.

ABSTRACT

MOURA, Talita de Paula Silva. **Cytological, anatomopathological and molecular study of bovine papillomavirus (BPV) in the reproductive tract of cows.** São Paulo. 2017. 82 f. São Paulo. 2017. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema) – Instituto Biológico, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, São Paulo, 2017.

The bovine papilloma virus-1 (BPV-1) DNA has been found in uterine lavage cows, indicating that the virus infects the feminine reproductive tract, but studies need to study its pathogenicity. It was investigated the BPV infection and its association to lesions in the reproductive tract of adult cows by different techniques: macroscopic and histologic lesions (hematoxylin and eosin staining - HE); immunohistochemistry (IHC) for oncogenic p16 and Ki-67 markers, and estrogen receptors (ER); cytological analysis of smear cervix by the Papanicolaou technique; nested-PCR for the L1 gene of BPV viral capsid using the primers FAP59/ FAP64, and Delta Epsilon F/ Delta Epsilon R. Tissue samples from 80 cows (ovaries, tubas, horns, body and cervix) and total blood in EDTA anticoagulant were collected in abattoirs in São Paulo state. Materials for histopathology were fixed in 10% buffered formalin; total blood and tissue samples for *nested*-PCR were kept frozen -20°C until analysis. Cervical swabs collected for cytological study were fixed into glass slides by polyethylene glycol spray. The macroscopy showed in 80 animals 5.0% metritis and 5.0% endometritis; in histopathology (HE) 25.0% samples showed nonspecific endometritis. The cytology found atypia in 25.0% of (20/80) samples: karyomegaly, binucleation and multinucleation. IHC and *nested*-PCR were performed in order to check for association between lesions and BPV infection. The *nested*-PCR and ICH p-16 were negative in all samples. 20 animals with cellular atypia (Papanicolau) were analyzed by HE confirming unspecific endometritis; ki-67 and ER IHQ detected positivity in 17.5% (14/80) samples by both biomarkers, identifying endometrial adenocarcinoma. It was demonstrated that the estrogen was a risk factor for this neoplasia.

KEYWORDS: BPV. *Reproductive bovine system. Females. Anatomopathology. IHC. nested-PCR.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação esquemática do genoma do HPV	6
Figura 2 -	Produtores de Leite no Estado de São Paulo	15
Figura 3 -	O protocolo resumido do uso do Kit <i>Envisiom Flex</i> (Dako®)	20
Figura 4 -	Região da cérvix uterina.	27
Figura 5 -	Corpo uterino com metrite puerperal aguda	27
Figura 6 -	Citologia	28
Figura 7 -	Endométrio normal	29
Figura 8 -	Útero normal	30
Figura 9 -	Endométrio com alterações Atípicas	30
Figura 10 -	Endométrio com alterações Atípicas	31
Figura 11 -	Endométrio normal na IHQ	32
Figura 12 -	Endométrio positivo para Ki-67	33
Figura 13 -	Endométrio positivo para Ki-67	33
Figura 14 -	Adenocarcinoma endometrial	34
Figura 15 -	Linfócitos marcados por Ki-67	34
Figura 16 -	IHQ de RE positivo	36
Figura 17 -	IHQ de RE positivo	36
Figura 18 -	IHQ de RE positivo	37
Figura 19 -	<i>Nested-PCR primer</i> Delta Epsilon, com o tamanho de 430pb	38
Figura 20 -	<i>Nested-PCR primers</i> FAP, com o tamanho de 478pb	38
Figura 21 -	Fotografia de adenocarcinoma endometrial	61
Figura 22 -	Fotografia de adenocarcinoma endometrial	61
Figura 23 -	Fotografia de adenocarcinoma endometrial	61
Figura 24 -	Fotografia de adenocarcinoma endometrial	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Funções dos genes do vírus do papiloma humano	7
Tabela 2 -	Relação dos frigoríficos e matadouro do Estado de São Paulo, locais onde foram realizadas as colheitas.	16
Tabela 3 -	<i>Primers</i> utilizados na <i>nested</i> -PCR para diagnóstico do BPV	23
Tabela 4-	Condições da <i>nested</i> -PCR no termociclador para os <i>primers</i> Delta Epsilon F e Delta Epsilon R	24
Tabela 5-	Condições da <i>nested</i> -PCR no termociclador para os <i>primers</i> Delta FAP59 e FAP64	25
Tabela 6-	Diagnóstico macroscópico uterino	26
Tabela 7-	Diagnóstico histopatológico	29
Tabela 8-	Diagnóstico de IHQ da Ki-67	32
Tabela 9-	Diagnóstico de IHQ de receptor de estrógeno (RE)	35
Tabela 10-	Diagnóstico do estado físico, macroscopia, citológico, histológico, IHQ p16 e Ki-67, Marcador de Estrógeno (RE) na IHQ e <i>nested</i> -PCR.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

Abr. - abril

Jan. - janeiro

Jun. - junho

Set. - setembro

Fev. - fevereiro

min. - minutos

Tab. - Tabela

Fig. - Figura

ed. - Edição

LISTA DE SIGLAS

EDTA - Ácido etilenodiamine tetra
PBS - Tampão fosfato salino
ASC - *American Society of Citology*
CCEV - Carcinoma de células escamosas vulvar
CCEVs - Carcinomas de células escamosas vulvares
DAB - 3,3'-diaminobenzidina
DNA - Ácido desoxirribonucléico
H.E. - Hematoxilina e Eosina
RE - Receptor de estrógeno
HPV - *Human papillomavirus*
IARC - *International Agency for Research on Cancer*
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia Viral
IHQ - Imunohistoquímica
INCA - Instituto Nacional do Câncer
LCR - *Long Control Region*
LIEs - Lesões intraepiteliais escamosas
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
OIE - Organização Mundial de Saúde Animal
PCR - *Polimerase chain reaction* (Reação em cadeia pela polimerase)
PV - Papilomavirus
BPV- Papiloma virus bovino
BPVs - Papilomas Virus Bovino
E - *Early*
L - *Late*
NCR - *Non-Coding-Region*

pRB - Proteína Retinoblastoma

VSCC - citologia em carcinomas de células escamosas da vulva

CECE - Carcinoma Epidermico de Células Escamosas

GD - Grau de diferenciação

CETEA-IB - Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto Biológico

SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DBCA - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais

MDs - Moderadamente diferenciados

PDs - Pobrememente Diferenciados

BDs - Bem diferenciados

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

AFIP - Instituto de Patologia das Forças Armadas dos Estados Unidos

ORF - Open Reading Frame

DAB -3,3'- diaminobenzidina

pH - Potencial Hidrogeniônico

UV - Radiação Ultravioleta

CP - Controle Positivo

CN - Controle Negativo

Pb - Pares de base

JEC - Junção Escamo Colunar

IA - Inseminação Artificial

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

ATP - Trifosfato de Adenosina

ATPase - Adenosinatrifosfatase

MCH - Complexo de Histocompatibilidade Maior

IATF - Inseminação Artificial em Tempo Fixo

PEPE - Prostaglandina Estrógeno Progesterona Estrógeno

GnRH - Gonadotrofina

LISTA DE SÍMBOLOS

μL - Microlitro

μM - Micromolar

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

® - Marca Registrada

% - Porcentagem

∞ - Infinito

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vi
AGRADECIMENTOS	vii
EPÍGRAFE	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURA	xvi
LISTA DE SIGLAS	xvii
LISTA DE SÍMBOLOS	xix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 BPV.....	5
2.2 INFECÇÃO CAUSADA PELO BPV.....	8
2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO BPV NO REBANHO BRASILEIRO.....	9
2.4 CITOLOGIA ONCÓTICA.....	11
2.5 HISTOPATOLÓGIA.....	11
2.6 IMUNOHISTOQUÍMICA DO BPV	11
2.7 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) UTILIZADA PARA AVALIAR A PRESENÇA DE BPV.....	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	15
3.2 AMOSTRAGEM	15
3.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	16
3.4 ANATOMOPATOLÓGICO.....	17
3.5 PAPANICOLAU	18
3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA	19

3.7 <i>nested</i> -PCR	22
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4 RESULTADOS	26
4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS.....	26
4.2 DIAGNÓSTICO MACROSCÓPICO DO ÚTERO.....	26
4.3 DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO.....	28
4.4 DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO.....	29
4.5 DIAGNÓSTICO DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	31
4.6 DIAGNÓSTICO DA <i>nested</i> -PCR.....	37
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

Os papilomavírus (PV) compõem um grupo altamente diverso de vírus que infectam os epitélios cutâneos e da mucosa, sendo capaz de induzir a lesão hiperplásica na maioria dos mamíferos e aves. No entanto, tem sido relatado que os PV podem ser detectados na pele saudável de seres humanos e animais como agentes comensais (CLAUS et al., 2009; RECTOR et al., 2006).

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, 2014), foram identificados 83 novos tipos de PV, caracterizados de 2010 a primeiro de junho de 2013. Estes incluem 40 papilomavirus humanos (HPV) e 43 PV não humanos. Os PVs são classificados em 30 gêneros, de acordo com a sequência de nucleotídeos ORF (*Open Reading Frame*) do gene L1, o mais conservado; as diferenças acima de 10% da mesma ORF definem um novo vírus, enquanto que até 10% de diferenças definem um novo subtipo viral (DE VILLIERS et al., 2004).

Os papilomavírus são estritamente específicos das espécies, mesmo em condições experimentais, não infectam nenhum outro hospedeiro do que o natural. O único caso conhecido de infecção cruzada é a infecção em equídeos pelo Papilomavirus Bovino (BPV) e BPV-2 natural em bovinos, que causam os sarcóides equinos (RECTOR et al., 2006). O sarcóide equino é notoriamente difícil de ser tratado. A cisplatina, droga quimioterápica utilizada para tratar tumores sólidos, tem sido uma estratégia terapêutica das mais eficazes para sarcóides, tumores de pele mais comuns em todo o mundo, afetando bovinos e equinos (FINLAY et al., 2012).

O papiloma vírus bovino (BPV) pertence à família Papillomaviridae, atualmente sabe-se que apenas 16 tipos de papilomavirus bovino: BPV-1 a 16 foram estudados (CLAUS et al., 2009; ICTV, 2014). Os BPV são pequenos vírus oncogênicos que causam papilomas e fibropapilomas em epitélio e mucosa cutânea de diferentes espécies animais (ICTV, 2014). Cada tipo de BPV é distinguido com base na sequência de DNA, e está associado à lesões de tipos específicos: BPV-1, BPV-2, BPV-13 e BPV-14 são classificados como genes *Deltapapillomavirus* e infectam o epitélio e a derme, dando origem a fibropapilomas; BPV-3, BPV-4, BPV-6, BPV-9, BPV-10, BPV-11 e BPV-12 são classificados no gênero *Xipapillomavirus* e são estritamente epiteliotrópicos, induzindo

verdadeiros papilomas epiteliais. O BPV-5 e BPV-8 são classificados no gênero *Epsilonpapillomavirus*, o BPV-7 é classificado no gênero *Dyoxipapillomavirus*, ambos infectam o epitélio e derme, e induzem fibropapilomas e papilomas da pele (HATAMA; NOBUMOTO; KANNO, 2008; ICTV, 2014).

Em bovinos, os diferentes tipos de BPV estão associados mais comumente a tecidos como a verruga cutânea (BPV-1 e BPV-2), a papilomatose e câncer do trato gastrointestinal (BPV-4), papilomas de tetas e úbere (BPV-1, BPV-5 e BPV-6), papiloma em pênis (BPV-1) e câncer de bexiga (BPV-1 e BPV-2) (CAMPOS et al., 2013).

A ocorrência de infecções múltiplas por papilomavírus tem sido demonstrada em vários estudos que envolvem o hospedeiro humano. Investigações com o objetivo de identificar infecções mistas por papilomavírus em bovinos têm sido realizadas. A análise de sequência de 10 clones obtidos de papiloma cutâneo bovino revelou que o produto da PCR foi gerado a partir de dois diferentes tipos de BPVs: o BPV-1 foi detectado em seis clones, enquanto o BPV-6 foi detectado em quatro clones. O resultado obtido da sequência de nucleotídeos apresentou 100% de similaridade com BPV-1 e BPV-6, confirmando que o papiloma bovino analisado abrigava dois tipos de BPV, um do gênero *Deltapapillomavirus* (BPV-1) e outro do gênero *Xipapillomavirus* (BPV-6). Resultado semelhante foi observado ao serem analisadas três tetas de bovinos com papiloma, no entanto, todos os tipos de BPV detectados pertenciam a um gênero único (CLAUS et al., 2009).

No Japão, observaram-se co-infecções de BPV em um número considerável de amostras de papilomas de teta e de pele saudável, caracterizando infecções duplas por BPV-1 e BPV-2. Em outro trabalho que avaliou os tipos de BPV envolvidos em um surto de papilomatose de teta, três das quatorze amostras analisadas também revelaram infecções duplas (CLAUS et al., 2009).

Investigações com amostras de pele saudáveis também demonstraram a ocorrência de infecções duplas em bovinos, provavelmente como uma condição latente. No entanto, a importância da identificação de uma infecção múltipla em pele saudável deve ser interpretada com cautela, uma vez que uma grande variedade de diferentes tipos de PV pode ser detectada em amostras de pele normal (CLAUS et al., 2009). Os BPV descritos como agentes infectantes específicos do epitélio têm sido associados a diversas formas de câncer em diferentes animais. Dada a intensa disseminação da papilomatose nos rebanhos,

a investigação de diferentes formas de transmissão e seus respectivos mecanismos tem exigido especial atenção (CARVALHO et al., 2003).

PV está presente em células de esperma de indivíduos humanos infectados e aparentemente saudáveis, e a lavagem de esperma não elimina o risco de transmissão. Recomenda-se que o sêmen de doadores potenciais seja submetido ao teste molecular para identificação do DNA de PV, para que aqueles com testes positivos sejam excluídos da doação (OLATUNBOSUN; DENEER; PIERSON, 2001).

A transmissão do BPV pode ocorrer através do contato entre animais infectados, áreas contaminadas ou fômites como ordenhadeira mecânicas, cordas, bebedouros e comedouros (MCBRIDE et al., 2012).

O DNA de BPV-2 foi encontrado em lavado uterino, ovócitos e células do *cumulus* de vacas, trazendo evidências de que a infecção viral pode se desenvolver fora do tecido epitelial. Esses achados alertam para a possibilidade de transmissão do BPV através dos procedimentos de transferência de embriões e de fertilização *in vitro* (CARVALHO et al., 2003).

Lesões teciduais ou microfissuras teciduais colaboram com o contágio pelo BPV, pois provocam a exposição de peptidoglicanos de sulfato de heparina presentes no citoplasma celular, no qual se tornam um sítio de ligação da proteína L1, causando endocitose viral (FERNANDES et al., 2013).

Em bovinos, a citologia oncótica e a histopatologia são pouco empregadas em estudo de lesões pré-cancerígenas. O que se tem comprovado até o momento é a presença do BPV no útero de bovinos por meio de técnicas moleculares, porém não foi comprovada a associação do patógeno à lesões uterinas.

A produção de leite no Brasil cresceu 4,3% ao ano, no período de 2000 a 2012, havendo registros de produção de leite em 555 microrregiões geográficas, das 558 existentes no país (IBGE, 2012), demonstrando sua importância econômica.

O conhecimento do impacto reprodutivo do BPV é uma etapa fundamental para justificar o diagnóstico e implantação de ações preventivas contra este agente nos rebanhos de aptidão leiteira.

1.1 OBJETIVOS

Gerais

Estudo citológico, anatomopatológico e molecular do BPV no trato reprodutivo de fêmeas bovinas de aptidão leiteira.

Específicos

- Identificar a presença de lesões causadas por BPV no trato reprodutor de fêmeas bovinas abatidas em frigoríficos.
- Avaliar lesões microscópicas por meio das técnicas de Hematoxilina e Eosina (H.E.) e Imunohistoquímica (IHQ) por marcadores anticorpo anti-proteína Ki-67, p16 e marcadores de receptores de estrógeno (RE).
- Análise de esfregaço de colo uterino para diagnóstico citomorfológico utilizando a coloração de Papanicolaou.
- Utilizar a técnica da *nested*-PCR utilizando os *primers* FAP59/ FAP64 e Delta Epsilon F/ Delta Epsilon R para investigar a presença de BPV nas regiões do aparelho reprodutor e sangue total.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BPV

O PV é formado por aproximadamente 8.000 pares de base organizados nos genes em E (*early*) e L (*late*), regiões que regulam a expressão viral e replicação do genoma. A região E é responsável pela sobrevivência viral e pela codificação de proteínas na expressão viral e replicação, enquanto a região L codifica proteínas estruturais e as NCR (*Non-coding Region*) - regiões não codificantes responsáveis pela replicação, sítios de ligação de multifatores de transcrição e regulação da RNA polimerase II (BOOY et al., 1998; LETO et al., 2011; RAMPIAS et al., 2013).

O DNA viral dos PVs possui ainda uma Longa Região de Controle “LCR” (*Long Control Region*) não-codificante (KANODIA; FATHEY; KAST, 2007; FERRARO et al., 2011). A região E codifica 7 ou 8 proteínas, as quais estão associadas à replicação do DNA viral, transcrição e transformação celular, executando as funções regulatórias vitais para a produção da progênie viral; a região L codifica duas proteínas do capsídeo responsáveis pela produção viral e empacotamento do DNA (KANODIA; FATHEY; KAST, 2007; THOMISSON; THOMAS; SHROYER, 2008; FERNANDES et al., 2013). As funções dessas proteínas estão resumidas na Tabela 1 (SANCLEMENTE; GILL, 2002).

A proteína E1 é responsável pela replicação do DNA viral e tem relação direta com a proteína E2, é a responsável pela transferência do DNA viral a células-filhas durante a divisão celular. A proteína E4 está relacionada com a maturação viral e alteração da matriz celular para a ampliação e liberação do DNA viral do HPV (IARC, 2007; MCBRIDE et al., 2012).

As proteínas E6 e E7 são comumente expressas nas células tumorais, por estimularem a proliferação celular descontrolada e impedirem a ação das proteínas supressoras de tumores p53 e pRb (proteína retinoblastoma) (ZUMBACH et al., 2000; CORTES, 1993).

As proteínas L1 e L2 estão presentes na estrutura do cápside viral (IARC, 2007; FERNANDES et al., 2013).

Os PVs apresentam capsídeo icosaédrico não envelopado com diâmetro de 52 a 55 nm. Devido à ausência de um envelope, o vírus é relativamente estável e resistente à dessecação, mantendo-se viável no meio extracelular por até uma semana (DOORBAR, 2005). A figura 1 apresenta a estrutura e organização do genoma viral:

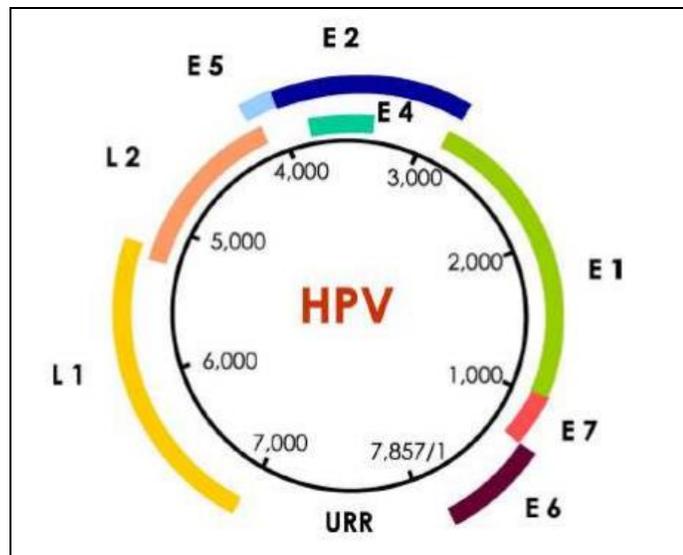


Figura 1 - Representação esquemática do genoma do HPV. Fonte: MUÑOZ et al., 2003.

Tabela 1 - Funções dos genes do papilomavírus. Fonte: SANCLEMENTE; GILL, 2002.

GENE	FUNÇÃO
E1	Atividade de DNA helicase, ligação de ATP DNA dependente, atividade de ATPase.
E2	Papel na replicação e na repressão da replicação. Regulação da transcrição e replicação viral. Controle da região da expressão (<i>Early</i>), necessária para a replicação viral eficiente junto com E1.
E3	Sem função conhecida (presente apenas em uma minoria de vírus)
E4	Expresso em epitélio em diferenciação, associado ao citoesqueleto de ceratina das células epiteliais, papel de liberação viral.
E5	Estimula o início da proliferação celular <i>in vivo</i> , e pode ter papel inicial na carcinogênese.
E6	Ativação transcricional junto com a E7 dos HPV's de alto risco inativando a p53 pela degradação rápida da via ubiquitina. Junto com a E7 propicia o ambiente celular para a replicação viral.
E7	Induz a síntese de DNA em células de repouso. E7 se liga a forma hipofosforilada da proteína retinoblastoma (pRb), resultando em sua inativação, permitindo a progressão da fase S do ciclo celular.
E8	Sem função conhecida (presente apenas em uma minoria de vírus)
L1	Proteína principal do capsídio (expressão tardia, <i>Late</i>).
L2	Menor proteína do capsídio.

2.2 INFECÇÃO CAUSADA PELO BPV

A infecção pelo BPV ocorre com a adsorção dos vírions às células basais do epitélio. Esta adsorção pode ocorrer com auxílio de lesões em microfissuras no tecido. A proteína L1, presente no capsídeo viral, se liga aos receptores de sulfato de heparina presentes na membrana celular do hospedeiro; o vírus vai sofrer uma mudança estrutural, expondo a proteína presente no capsídeo L2, que é quebrada pela furina, que permite a ligação do vírus à integrina alfa 6, que promove endocitose das partículas virais (MCBRIDE et al., 2012). O DNA do PV é detectado mais comumente como moléculas episomais em lesões benignas, em linfócitos e em lesões precursoras. Nas lesões benignas, há um grande número de partículas virais. Quando as lesões benignas são persistentes, a expressão dos receptores MCH-I, MCH-II e Toll-like mantém a presença do BPV por um longo tempo (MANGLENNON; DOORBAR, 2012).

Quando as lesões pelo PV progridem para lesões malignas, o DNA viral é geralmente integrado no genoma da célula hospedeira, havendo apenas uma cópia de DNA viral para cada célula hospedeira. Isso é um passo importante na progressão de uma lesão, sendo necessário para a detecção de lesões malignas em PV o uso de técnicas de diagnóstico com elevada sensibilidade e especificidade, como a biologia molecular (WOZNIACKI et al., 2005).

Carvalho et al. (2003) relataram a detecção de sequências de DNA do BPV em tecidos do trato reprodutivo feminino, fluídos e oócitos de bovinos abatidos, não apresentando papilomatose cutânea. Sequências de DNA de BPV-2 foram encontradas em tecidos ovarianos e uterinos, bem como em oócitos, células de *cumulus* e lavados uterinos. A presença de sequências do BPV em tecidos de órgãos reprodutivos e líquidos mostra que a infecção viral pode ser verificada em outros tecidos. Esses achados alertam para a possibilidade de transmissão do BPV em programas de transferência de embriões e procedimentos de fertilização assistida.

No Japão, Ogawa et al. (2004) identificaram mais 10 supostos tipos de BPV, demonstrando que, a exemplo do HPV, a diversidade de tipos do BPV também pode ser bastante ampla. Portanto, esse número pequeno de tipos virais conhecidos parece ser falha metodológica na determinação dos tipos presentes em infecções, e não da inexistência de

diversidade antigênica e molecular em BPV. No Brasil, independentemente do nível de tecnificação da exploração pecuária, a infecção pelo BPV pode ser encontrada em rebanhos bovinos de corte e, principalmente, nos de aptidão leiteira em praticamente todo o país. Apesar da alta frequência da infecção, a determinação dos tipos virais circulantes nos rebanhos ainda é bastante esporádica (CLAUS et al., 2007).

Nos estudos envolvendo amostras brasileiras foi possível detectar a infecção pelo BPV-2 em papilomas cutâneos, sangue, placenta e líquido amniótico, o que pode sugerir a possibilidade de transmissão vertical (FREITAS et al., 2003; ROPERTO et al., 2008).

A infecção pelo BPV causa lesões hiperplásicas no epitélio cutâneo dos animais, de acordo com a localização e as características morfológicas das lesões. No estudo do BPV presente em lesões cutâneas em bovinos de rebanhos do Estado do Paraná, foi possível identificar BPV-2 em três amostras, o BPV-1 em uma e o BPV-6 em cinco amostras de papilomas. O BPV-6 foi encontrado tanto em papilomas localizados no teto quanto em outras regiões do corpo do animal. Em um dos animais, do qual foram colhidas mais de uma amostra, foi detectada infecção concomitante do BPV-1 com o BPV-2 (CLAUS et al., 2007).

As formas de transmissão pelo BPV são por contato direto entre animais infectados (monta), por fômites (pipetas de inseminação, cordas e ordenhadeiras elétricas), e através de áreas contaminadas (McBRIDE et al., 2012).

2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO BPV NO REBANHO BRASILEIRO

A papilomatose bovina causa perdas econômicas em propriedades leiteiras no Brasil. Bovinos com papilomatose disseminada no trato gastro intestinal superior tem dificuldades em se alimentar e respirar e são abatidos, causando perdas econômicas (CAMPOS et al., 2013).

Papilomatose em tetos e úberes não é apenas um problema de saúde entre os animais, mas também de perdas econômicas para o produtor, uma vez que os papilomas em tetos de vacas dificultam ou impedem a ordenha e a amamentação dos bezerros jovens, e ocasionalmente o rebanho inteiro tem de ser abatido se a papilomatose não regredir (CAMPOS et al., 2008; MELO et al., 2014).

Lesões papilomatosas podem estar presentes no pênis do touro e interferem na função reprodutiva normal do animal, que por ter dificuldade em se reproduzir, deve ser abatido (BLOCH, 1997).

Hematúria Enzoótica Bovina e Papilomatose Bovina podem prejudicar a balança comercial agropecuária em todo o mundo, causando perdas econômicas, principalmente em rebanhos bovinos de corte onde a taxa de mortalidade de vacas é maior em regiões endêmicas para hematúria enzoótica do que em regiões livres. Muitos estudos demonstram a participação da BPV-2 e BPV-1 na etiologia da hematúria enzoótica. Para o desenvolvimento de lesões de PV e sua progressão para a neoplasia é necessária uma interação entre os co-agentes cancerígenos externos e imunossupressores presentes na samambaia e o BPV-1 (CARVALHO et al., 2003; TAN et al., 2012; PATHANIA et al., 2012; WOZNIACKI et al., 2005).

Quatro surtos de papilomatose em rebanhos bovinos foram documentadas em Estados brasileiros, estando as lesões papilomatosas localizadas no tetos, úbere, cabeça e pescoço (CATROXO et al., 2013).

O BVP induz fibropapilomas na cabeça e no pescoço dos animais e está associado à lesões naturais da bexiga urinária, embora possam estar relacionados com fibropapilomas no esôfago e rúmen (CARVALHO et al., 2003; WOSIACK et al., 2012).

O aumento do uso da transferência de embriões e técnicas de fertilização *in vitro* exige estudos precisos para avaliar a presença do BPV no trato reprodutivo feminino e gametas para controle das doenças do trato reprodutor. O tipo viral mais frequente é o BPV-2 (CARVALHO et al., 2003; ROPERTO et al., 2008).

A presença de agentes infecciosos em bovinos aponta a necessidade de implantação de medidas higiênico-sanitárias, a fim de prevenir a infecção ascendente do trato genital (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

2.4 CITOLOGIA ONCÓTICA

Em 1928, o Dr. Georgios N. Papanicolaou foi precursor da Citopatologia, descobrindo a técnica de coloração multicromática, composta por Hematoxilina de Harris, Orange G e Policromos EA-36. Esta técnica auxilia na avaliação citomorfológica de células neoplásicas (PAPANICOLAOU, 1942; NAKAGAWA et al., 2010).

Citologia Oncótica é um método de rastreamento para diagnóstico de câncer de colo uterino em humanos, sendo necessário associar à esta o exame histopatológico como padrão ouro. Em estudo comparando o diagnóstico citológico/colpocitológico com histologia, em rastreamento de 63 biópsias de colo uterino, obteve-se 43,8% de sensibilidade e 80,9% de especificidade, sendo 71% a concordância entre os dois exames (PIAS; VARGAS, 2009).

2.5 HISTOPATOLOGIA

A análise histopatológica da amostra representativa da lesão causada pelo HPV é utilizada para confirmar e graduar a mesma, porém não é capaz de identificar o BPV como agente causal da lesão, sendo possível confirmar esta informação somente pelas técnicas de biologia molecular (CAMARGOS; HUGO, 2001) e “Southern Blot” e PCR (WOZNIACKI et al., 2005; LETO et al., 2011).

Os efeitos causados pelo PV podem ser observados macroscopicamente em lesões classificadas como atípicas, pedunculadas e planas. Na microscopia, as atipias observadas são coilocitose (halo claro peri-nuclear), aumento do núcleo e da relação núcleo:citoplasma, binucleação, irregularidade de membrana nuclear, hipercromasia nuclear, classificados segundo o sistema Bethesda (ASC, 2001; LUNARDI et al., 2013; DA SILVA et al., 2015).

2.6 IMUNOHISTOQUÍMICA DO BPV

A imunohistoquímica (IHQ) permite detectar proteínas virais do PV que se encontram nas lesões observadas na microscopia óptica, em material incluído em parafina ou em preparados citológicos. Na prática, utilizam-se anticorpos policlonais contra antígenos específicos do HPV (CARVALHO; OYAKAWA, 2000; MUNDAY et al., 2007).

A IHQ para a proteína L1 do vírus tem alta especificidade, porém detecta apenas as fases epissomais encontradas nas lesões de baixo grau, como condilomas e papilomas. Quando quando o vírus não está na fase epissomal e ocorreu a integração do genoma viral

à célula hospedeira, o vírus causa lesões no DNA do hospedeiro as lesões passam a ser pré cancerígenas e se torna mais difícil detectar L1 (CARVALHO; OYAKAWA, 2000).

A IHQ tem revolucionado a anatomia patológica, auxiliando o diagnóstico de diferentes tipos de neoplasias e permite a identificação de proteínas enzimáticas, receptores, produtos de genes entre outros (SCHMITT et al., 1998). A IHQ tem o papel de análise da infecção virótica por meio da detecção de proteínas relacionadas ao HPV em material de patologia cirúrgica, sendo técnica muito específica, porém pouco sensível.

A partir da utilização de um marcador prognóstico é possível estudar as características de células normais e neoplásicas, o crescimento de tumores e o processo de metástase. As displasias podem ser analisadas por meio de alguns marcadores, principalmente antígeno Ki-67 e proteína p16 (INCA, 2006). O controle da divisão celular é um evento crítico para o funcionamento normal das células. Os processos reguladores da carcinogênese interferem diretamente ou indiretamente na proliferação celular. As células em proliferação expressam em seus núcleos uma proteína não-histona de meia-vida curta, chamada Ki-67 (HAHN; WEINBERG, 2002). Em relação aos marcadores de proliferação celular, o antígeno Ki-67 é considerado, atualmente, o de maior acurácia, sendo analisado em diversos tipos de neoplasias. O antígeno Ki-67 está presente em todas as fases do ciclo celular, com exceção de G0 (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

A expressão de p16INK4a foi observada em 85,3% (29/34) das mulheres positivas para HPV e esta associação foi estatisticamente significativa ($p=0,02$), sendo que todas as biópsias positivas para HPV-16 (16/34) expressaram a proteína ($p=0,01$). Houve uma associação estatisticamente significativa entre a intensidade de expressão, o padrão de expressão de p16INK4a e Ki-67 e o grau da lesão, mostrando-se biomarcadores eficientes em avaliar lesões pré cancerígenas de alto grau (MYLIUS, 2008).

A sensibilidade dos biomarcadores p16INK4a e Ki67 em lesões escamosas de baixo grau no colo uterino de mulheres não expressou diferenças significativas. A expressão dos biomarcadores em pacientes atróficas e distróficas que apresentaram lesões escamosas de alto grau em colo uterino foi satisfatória. Os biomarcadores são usados como estratégias de rastreamento do HPV, podendo confirmar resultados citológicos e histopatológicos (ROSSI, 2015).

A expressão do Ki-67 em achados clínico- patológicos de carcinoma escamoso de colo uterino em mulheres indicou correlação significativa entre a expressão da proteína Ki-67 com o tamanho tumoral, disseminação linfática e sobrevida da doença, mas não com o grau de diferenciação tumoral. Outro estudo retrospectivo evidenciou menor sobrevida nas pacientes com maior expressão tumoral de Ki-67 (GARZETTI et al., 1995).

Vários trabalhos estão usando a imunohistoquímica para avaliação da carcinogênese por meio de diferentes biomarcadores tais como receptores hormonais de estrogênio (RE) e índice de proliferação celular (Ki-67), esses marcadores têm mostrado a contribuição dessas moléculas para o desenvolvimento do carcinoma endometrial (MORIN, 2005).

A expressão de marcador dos receptores de estrógeno na IHQ é encontrada principalmente em carcinoma endometrióide; em estágio inicial pode-se encontrar receptores para estrógeno e progesterona, porém, quando o carcinoma endometrial possui um estágio avançado, ocorre uma falha na expressão de receptores de progesterona e os receptores de estrógeno são mais expressados (BONFITTO, 2002).

2.7 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) UTILIZADA PARA AVALIAR A PRESENÇA DE BPV

As diferentes técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresentam uma discrepância nas taxas positivas quando utilizadas em diferentes amostras clínicas. Assim, para a detecção do gene L1 do BPV-2 em amostras clínicas com baixo número de cópias virais, deve-se avaliar o número de cópias no sangue total, sendo possível também haver infecção de mais de um genótipo de BPV no mesmo animal (WOZNIACKI et al., 2005).

O desenvolvimento de técnicas utilizadas para a reprodução bovina resultou na necessidade de controle das doenças do trato reprodutivo. Ressalta-se a possibilidade de transmissão dos agentes infecciosos por transferência de embriões, no entanto são poucos os dados sobre a detecção de BPV em tecidos do trato reprodutivo feminino bovino. CARVALHO et al. (2003) detectaram pela PCR o BPV-2 no trato reprodutivo e gametas femininos, mas não associaram sua presença à lesões teciduais. Estes autores discutem que a presença do BPV-2 na corrente sanguínea, teoricamente, permite que partículas virais sejam levadas a quaisquer tecidos irrigados. Esta viremia poderia explicar a presença de BPV-2 nos ovários, útero, *cumulus* e oócitos dos animais investigados, porém não explica patologia.

Atualmente, existem diferentes *primers* usados para pesquisa de BPV, inicialmente desenhados para detecção de HPV em mucosas e que também têm sido aplicados em estudos que abordam a diversidade do BPV. A Delta Epsilon F/Delta Epsilon R e FAP59/FAP64 são *primers* utilizados para amplificação do gene L1 do BPV presente em pele e mucosa (FORSLUND et al., 1999; MAEDA et al., 2007; ARALDI, 2014).

O vírus em papiloma de pele, quando em título elevado, facilita sua identificação genômica. Porém, em tecidos neoplásicos, como, por exemplo, o encontrado na bexiga urinária, o BPV integra-se ao genoma celular e apresenta baixos níveis de detecção viral (CARVALHO et al., 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto Biológico (CETEA-IB) em 29 de outubro de 2015, estando registrado sob o número de protocolo 145/15. Atende os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) (Anexo 1).

3.2 AMOSTRAGEM

Foram amostradas 80 vacas de aptidão leiteira abatidas na faixa etária de três a cinco anos para análise laboratorial. Todos os animais eram provenientes de frigoríficos sob inspeção sanitária na região do Vale do Paraíba, uma das mais importantes bacias leiteiras do Estado de São Paulo, LEITE BRASIL, 2005/2006 (Fig. 2).

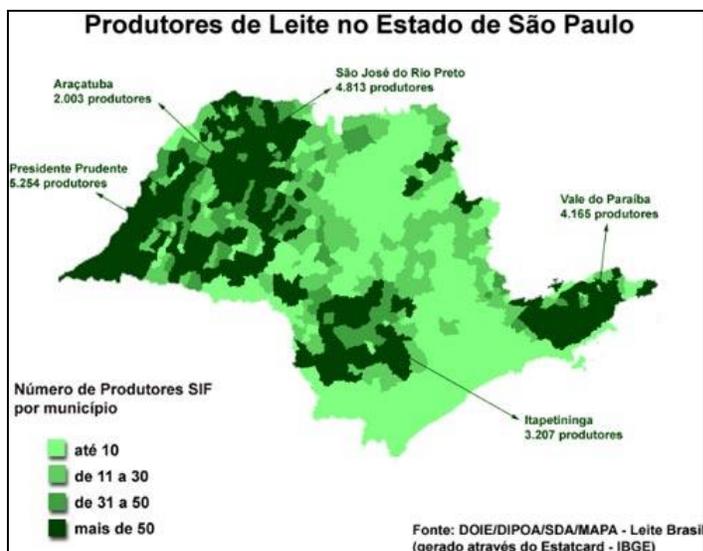


Figura 2 – Produtores de Leite no Estado de São Paulo. Fonte: LEITE BRASIL, 2005/2006.

Os locais e datas de colheitas das amostras estão relacionados na Tab. 2.

Tabela 2 - Relação dos frigoríficos e matadouro do Estado de São Paulo, locais onde foram realizadas as colheitas.

FRIGORÍFICO E MATADOURO	LOCAL	DATA	NÚMERO DE AMOSTRAS
Multicortes	Pindamonhangaba-SP 12/05/2015	12/05/2015	07
Multicortes	Pindamonhangaba-SP 15/05/2015	15/05/2015	18
Multicortes	Pindamonhangaba-SP 26/05/2015	26/05/2015	19
Multicortes	Pindamonhangaba-SP 29/05/2015	29/05/2015	12
Multicortes	Pindamonhangaba-SP 08/06/2015	08/06/2015	14
Multicortes	Pindamonhangaba-SP 22/06/2015	22/06/2015	04
Frigorífico Jatobá	São José dos Campos – SP 21/03/2016	21/03/2016	06

3.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS

Após o abate, o trato reprodutor das vacas foi extraído e submetido à análise macroscópica, visualizando a conformação, cor, presença de possíveis lesões em ovários, tubas uterinas, cornos uterinos, corpo uterino e cérvix. As amostras de citologia de cérvix uterina para o Papanicolaou foram colhidas com suabe, e realizado esfregaço em lâmina de

vidro e fixadas com *spray* (CARBOVAX®). Foram coletados fragmentos dos órgãos reprodutores para histopatologia e imunohistoquímica e fixados em formol 10% tamponado por até 24 horas. Fragmentos de tecido e sangue total colhidos em frascos de tubo a vácuo com EDTA foram congelados a -20°C para realizar posteriormente a *nested*-PCR. As amostras de tecidos para *nested*-PCR foram mantidas congeladas a -20°C até realizar esta análise.

Os tecidos para estudo histopatológico e citológico foram processadas no Laboratório de Anatomia Patológica, a *nested*-PCR no Laboratório de Viroses de Bovídeos do Instituto Biológico, e a IHQ para as proteínas p-16 e Ki-67, e o receptor de estrógeno (RE) foram analisadas pelo Laboratório APC - Apoio em Patologia Cirúrgica (São Paulo/SP) .

3.4 ANATOMOPATOLOGICO

Técnicas histológicas

A histotécnica (desidratação, diafanização, emblocagem em parafina, microtomia e coloração hematoxilina/eosina) foi realizada segundo o protocolo descrito no Manual de Métodos Histotecnológicos do Instituto de Patologia das Forças Armadas dos Estados Unidos (AFIP, 1995).

Emblocagem em parafina e coloração Hematoxilina e Eosina (H.E.)

Os fragmentos dos órgãos do trato reprodutor (ovários, tubas uterinas, cornos uterinos, corpo uterino e cérvix uterina) foram fixados em solução de formol tamponado a 10%, por um período de 48 horas. Posteriormente foi realizada a bateria de desidratação onde o material passou por diversas soluções de álcool etílico, diafanização pelo xilol, impregnação em parafina líquida e emblocagem em parafina (AFIP, 1995).

O tecido emblocado em parafina foi cortado em micrótomo (3 µm de espessura), estendido em banho-maria (60°C) e colocado em lâmina de vidro tratada previamente com albumina, para facilitar a adesão do corte histológico na lâmina. Em seguida, a lâmina ficou

em estufa 60°C até a desparafinização, sendo posteriormente corada pela hematoxilina/eosina (AFIP, 1995). O protocolo de coloração das lâminas foi assim realizado: desparafinização em dois banhos de Xilol por cinco minutos, hidratação em sucessivos banhos de álcool etílico (absoluto, 95%, 80% e 70%) por dois minutos, e a coloração em Hematoxilina por 30 segundos, água corrente por 15 minutos e corado pela Eosina por dois minutos, lavagem em água corrente rapidamente para tirar o excesso do corante eosina; em seguida as lâminas foram desidratadas em sucessivos banhos de álcool etílico a 70%, 80%, 90% por 1 minuto e álcool absoluto (duas vezes) por cinco minutos; por fim o material foi diafanizado em dois banhos de Xilol por cinco minutos cada (AFIP, 1995). A montagem de lâmina e lamínula foi realizada com resina Entellan (Merck®).

3.5 PAPANICOLAOU

Foi realizado em lâminas de esfregaço de colo uterino o método de Papanicolaou (PAPANICOLAOU, 1942), modificado por OLIVEIRA; MOTA, VIEIRO (2000), para evidencia da morfologia, graus de maturidade e de atividade metabólica celular. Utilizou-se hematoxilina - corante básico, com afinidade pelo núcleo das células; Orange G - corante ácido que se combina com o citoplasma das células queratinizadas; EA-65 - corante policromático, que oferece tonalidades de cores diferentes no citoplasma das células. Este método abrangeu cinco etapas, como segue:

- 1- Hidratação: as células foram submetidas gradualmente por banhos de concentrações decrescentes de álcool etílico (90%, 80%, 70% e 50%) em seguida banho de água corrente.
- 2- Coloração nuclear: as células hidratadas foram coradas com hematoxilina de Harris.
- 3- Desidratação: retirou-se a água das células com banhos de álcool etílico em concentrações crescentes (70%, 80% e 90%).
- 4- Coloração citoplasmática: o citoplasma das células foi corado por Orange G e EA-65, de modo a diferenciar com diversas tonalidades de acordo com a sua maturidade e metabolismo celular.
- 5- Desidratação, clarificação e selagem: a água intracelular foi retirada com banhos de álcool etílico absoluto, as células foram clarificadas com xilol e seladas com meios permanentes e hidrofóbicos.

3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os biomarcadores utilizados foram: o anticorpo Ki-67- clone MIB-1- pré diluído (FLEX) com recuperação antigênica em pH baixo com *linker Mouse* da DAKO®, e o anticorpo p16 , clone G175-405 – diluição 1:100, e recuperação antigênica em pH alto com *linker Mouse* da Medaysis. Marcador de receptor de estrógeno (RE), clone – ID5 – diluído 1:20, e recuperação antigênica em pH alto *linker Mouse* da DAKO®. Os equipamentos utilizados foram PT LINK (desparafinização e hidratação da lâminas) da DAKO® e o COVERSLEEPER (montador de lâminas com lamínulas) da DAKO®.

Utilizou-se como controle positivo um papiloma cutâneo bovino, positivo na PCR para BPV, confirmado por sequenciamento como BPV-1, como controle negativo foram usadas as amostras que não foram marcadas por Ki-67, RE e p16.

Preparação do Corte

- Os blocos foram entregues à área de histotécnica após a triagem (identificação), e colocados no freezer para gelar;
- Após resfriamento do bloco, foram realizados cortes de 2 micras em micrótomo manual;
- Os cortes foram colocados em banho-maria à +/-65°C e “pescados” nas lâminas já identificadas com o número do caso;
- Estas lâminas foram colocadas em estufa à 60°C por 40 minutos para o início da desparafinização.

Preparação no período noturno

- As lâminas foram colocadas em berços de coloração devidamente numeradas para serem distribuídas nos tanques dos ptLink (equipamento em comodato DAKO®) e de acordo com o pH determinado.
- Fecharam-se os ptLink, fez-se a programação na tela do Menu de cada equipamento, verificou-se horário, dia da semana, temperatura e programação de início do processo.

- Finalmente verificou-se se o NO-BREAK estava ativo corretamente, a fim de garantir o início do processo no período da manhã.

Processo da imunohistoquímica - Período da manhã

- O processo de desparafinização e re-hidratação das lâminas ocorrem nas máquinas ptLink com água deionizada e soluções prontas de pH baixo e pH alto que atingirão uma temperatura de aproximadamente 180°C num período de 72 minutos a partir das 4:00 AM em soluções de pH alto e baixo.
- A continuidade do processo se dá com o uso do kit Encision Flex da DAKO® (Fig. 3) para a realização da reação imunohistoquímica, juntamente com o uso de anticorpos concentrados (a serem diluídos) e *flex* (já diluídos) de acordo com seus respectivos pH's.



Protocolo EnVision™ FLEX		Protocolo EnVision™ FLEX +	
Etapa	Tempo	Etapa	Tempo
1. EnVision™ FLEX Peroxidase Block	5 minutos	1. EnVision™ FLEX Peroxidase Block	5 minutos
Solução de Lavagem	5 minutos	Solução de Lavagem	5 minutos
2. Anticorpo primário FLEX RTU	20 minutos	2. Anticorpo primário FLEX RTU	20 minutos
Solução de Lavagem	5 minutos	Solução de Lavagem	5 minutos
3. EnVision™ FLEX /HRP	20 minutos	3. EnVision™ FLEX+ (Linker)	15 minutos
Solução de Lavagem	2 x 5 minutos	Solução de Lavagem	5 minutos
4. EnVision™ FLEX Substrate Working Solution	2 x 5 minutos	4. EnVision™ FLEX /HRP	20 minutos
Solução de Lavagem		Solução de Lavagem	2 x 5 minutos
5. EnVision™ FLEX Hematoxylin	5 minutos	5. EnVision™ FLEX Substrate Working Solution	2 x 5 minutos
Água destilada ou deionizada		Solução de Lavagem	
Solução de Lavagem	5 minutos	6. EnVision™ FLEX Hematoxylin	5 minutos
Água destilada ou deionizada		Água destilada ou deionizada	
		Solução de Lavagem	5 minutos
		Água destilada ou deionizada	

Obs.: Quando realizados os dois protocolos simultaneamente, após a etapa 2 deixar as lâminas em solução de lavagem enquanto se incuba o "Linker" do protocolo EnVision™ FLEX +. Após isto, todas as etapas serão semelhantes para ambos os protocolos.

Figura 3- O protocolo resumido do uso do Kit Envisiom Flex (DAKO®)

A seguir a descrição detalhada do processo resumido na figura 3.

- Abrir as tampas do PT LINK e deixar esfriar por 30 minutos para que não haja choque térmico nas lâminas.
- Retirar os carrinhos do PT LINK;
- Mergulhar 10 vezes em solução tampão e deixar descansar por 5 minutos.
- Trocar o tampão, repetir o procedimento e deixar mais 5 minutos em descanso;
- Retirar os carrinhos com as lâminas da solução, tirar dos carrinhos uma a uma, secar nos arredores do fragmento com campo cirúrgico, fazer um círculo com a caneta hidrofóbica DAKO® PEN ao redor do fragmento delimitando-o, e distribuir as mesmas nas caixas acrílicas lado a lado. Em seguida pipetar 100 μ L de peroxidase block e deixar por 5 minutos em descanso;
- Em seguida lavar com solução tampão (WASH) as lâminas e deixar também por 5 minutos em descanso;
- Retirar o excesso de solução tampão, levantando uma lâmina por vez, devolver na caixa novamente para pipetar o anticorpo primário já diluído, conforme designado nas lâminas previamente etiquetadas. O processo de incubação dos anticorpos deve seguir as instruções a seguir:

Incubação com anticorpo primário

- Utilizar anticorpos que já vem pré-diluídos (FLEX) ou concentrados, diluídos em diluente DAKO®.
- Enxugar as lâminas que estavam na água deionizada com campo cirúrgico ou papel toalha, tomando o cuidado de não estragar fragmento.
- Delimitar a área do corte com caneta Dako Pen.
- Pingar 100 μ L do anticorpo primário em cima do corte.
- Colocar as lâminas dentro de uma caixa de acrílico ou recipiente plástico, e incubou-se por 30 minutos em temperatura ambiente.
- Lavar as lâminas com tampão Dako na própria cuba, utilizando pisseta.

- Após a reação com os anticorpos primários, lavar as lâminas novamente nas caixas acrílicas com solução tampão (WASH) e deixar novamente em solução tampão por 5 minutos;
- Retirar o tampão levantando as lâminas, levantando uma lâmina por vez, devolver na caixa novamente e pipetar o polímero HRP e deixar incubar por 20 minutos;
- Após, entrar novamente em processo de lavagem com a solução tampão por 2 vezes e descansar de 5 minutos em cada etapa;
- No caso de anticorpos (anti camundongo ou anti coelho) incubar o linker por 15 minutos e depois lavar com tampão;
- Na próxima etapa entrar em processo de revelação com o cromógeno *Substrate Working Solution* (equivalente ao DAB), onde pipeta-se 2 vezes e permanece em reação por 7 minutos em cada uma das vezes;
- Depois, lavar as lâminas com solução de lavagem (tampão wash) e colocá-las em carrinhos que serão levados às cubas de hematoxilina por 30 segundos em descanso, para depois serem lavadas em água corrente;
- Em seguida, mergulhar cada carrinho na bateria de 4 cubas de álcool absoluto e 8 cubas de xilol, até serem trocadas de carrinhos e levadas à máquina de montagem de lâminas (COVERSLEEP – DAKO®).

3.7 *nested*-PCR

Para a extração de DNA foi utilizado o *kit Cador Pathogen* (Qiagen®), que se baseia na lise de membranas celulares e realizado em sistema automatizado de extração (Qiacube HT - Qiagen®). Após descongelado, os fragmentos do tarto reprodutor foram macerados e adicionados 500 µL de solução salina tamponada 0,9% (pH 7,2). Esse material foi transferido para a *rack* de extração e seguiu o protocolo do kit no Qiacube HT. Após este procedimento, o material foi mantido a temperatura de -20°C.

A amplificação do segmento de DNA foi realizada empregando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) genéricos para o gene que codifica a proteína L1 do capsídeo viral de Papilomavírus descritos por Forslund et al. (1999) e Maeda et al. (2007) (Tab. 3).

Tabela 3 - *Primers* utilizados na *nested*-PCR para diagnóstico do BPV.

Sequência de nucleotídeos (5'- 3')			
<i>Primers</i>	Sequência de nucleotídeos	Tamanho	Autor e Ano
FAP59	5'-TAACWGTIGGICAYCCWTATT-3'	478 pb	FORSLUND et al. (1999)
FAP64	5'-CCWATATCWVHCATITCICCATC-3'	478 pb	FORSLUND et al. (1999)
Delta Epsilon F	5'-CCAGAYTAYYTMAAAAATGGC-3'	430 pb	MAEDA et al. (2007)
Delta Epsilon R	5'- ATAAMKGCTAGCTTATATTC-3'	430 pb	MAEDA et al. (2007)

Amplificação do gene Delta Epsilon F e Delta Epsilon R pela *nested*-PCR

Resumidamente, as condições de amplificação de BPV pela *nested*-PCR no termociclador estão representadas na tabela 4. O *mix* da reação foi feito com o kit PCR Master Mix da Promega. Esse *mix* é uma solução pronta, contendo Taq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampões de reação. O *mix* PCR consistiu em 8,5 µL de *Nuclease Free Water*, com 1 µL de Delta Epsilon F 10 pmol. e Delta Epsilon R 10 pmol, PCR *Master Mix* (Promega®) 12,5 µL o volume total foi de 23 µL, foi utilizado para a reação 2 µL de DNA. A análise dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese (100V/60min) em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris, borato, EDTA pH 8,0 e evidenciada em gel RED (1:150). A imagem do gel sob luz UV foi registrada em fotodocumentador acoplado a computador.

Tabela 4 - Condições da *nested*-PCR no termociclador para os *primers* Delta Epsilon F e Delta Epsilon R.

N° de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1 ciclo	94	10 min
35 ciclos	94	1 min
	52	1 min
	72	1 min
1 ciclo	72	10 min
<i>Hold</i>	4	∞

Amplificação do gene FAP59 e FAP64 pela *nested*-PCR

As condições da *nested*-PCR no termociclador estão representadas na tabela 5. O *mix* da reação consistiu em 3,75 µL *Nuclease Free Water* com 1,075 µL de FAP59 10 pmol e FAP64 10 pmol, PCR *Master Mix* (Promega ®) 12,5 µL, o volume total foi de 20 µL, foi utilizado para a reação 5 µL de DNA. A análise dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese (100V/60min) em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris borato, EDTA pH 8,0 e evidenciada em gel RED (1:150). A imagem do gel sob luz UV foi registrada em fotodocumentador acoplado a computador.

Tabela 5 - Condições da *nested*-PCR no termociclador para os *primers* FAP59 e FAP64.

N° de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1 ciclo	94	5 min
45 ciclos	94	1 min
	49,3	1 min
	72	1 min
1 ciclo	72	5 min
<i>Hold</i>	4	∞

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo da frequência de ocorrência (%) das lesões macroscópicas e microscópicas e de marcadores de IHQ foi realizado segundo CÔRTEZ (1993).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

De 80 vacas avaliadas, apenas uma (1%) apresentou na pele, nas regiões do dorso, pescoço, rabo e focinho, lesões papilomatosas em forma fungiforme (couve-flor) em coloração enegrecida, medindo de 2,0 a 6,0 centímetros por 2,0 a 5,0 centímetros.

4.2 DIAGNÓSTICO MACROSCÓPICO DO ÚTERO

O diagnóstico macroscópico revelou que 72 vacas (90,0%) não apresentaram alterações patológicas (Tab. 6) (Fig. 4A). Em quatro vacas (5,0%) foram observadas lesões macroscópicas sugestivas de endometrite (Tab. 6), que é uma inflamação restrita ao endométrio. Essas inflamações são caracterizadas por presença de edema, hiperplasia endometrial, acúmulo de fluidos, hemorragias, fragmentos aderentes de fibrinas e debris necróticos. Em outras quatro (5,0%) foi evidenciado metrite (Tab. 6), que é a inflamação de todas as camadas da parede uterina e apresenta edema generalizado, serosa escura, descarga achocolatada de odor fétido, finamento granular com hemorragia petequiral e finos feixes de fibrinas aderidas com debris necróticos (Figs. 4B e 5). Não foram observadas lesões papilomatosas na análise macroscópica dos úteros das vacas.

Tabela 6 – Diagnóstico macroscópico uterino

Diagnóstico macroscópico uterino		
Descrição	Total	%
Ausência de lesões uterinas	72	90,0
Endometrite	4	5,0
Metrite	4	5,0
Total	80	100,0

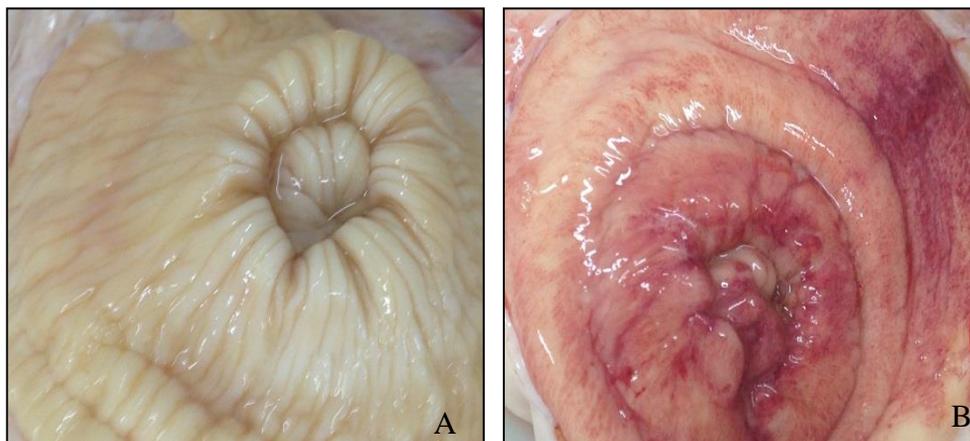


Figura 4 – Região da cérvix uterina. (A) Cérvix uterina normal. (B) Cérvix uterina com metrite apresentando (edema, petéquias e sufusões).

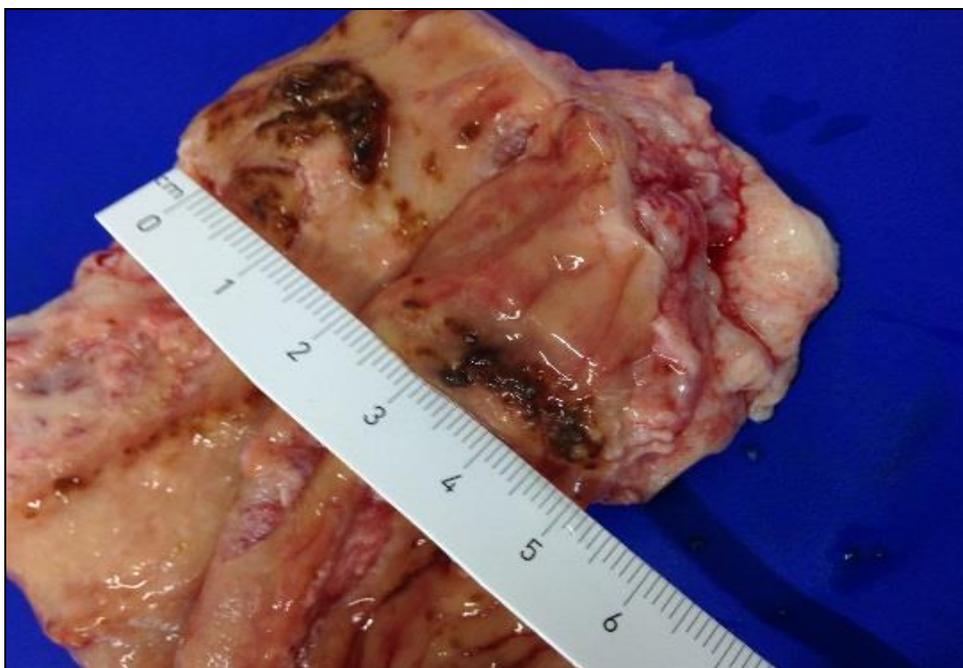


Figura 5 - Corpo uterino com metrite puerperal aguda: feixes de fibrina e debris necróticos aderidos, cicatrização, edema e descarga uterina de coloração achocolatada.

4.3 DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO

As citologias que foram avaliadas tiveram consenso com o diagnóstico histopatológico. De 80 animais examinados, 20 (25%) apresentaram atipia celular. As atipias celulares observadas nestes 20 animais foram assim classificadas: cariomegalia, binucleação e multinucleação (Fig. 6). Estas alterações são características de reparos celulares e que podem estar associadas a algum trauma ou agente (s) infeccioso (s) a esclarecer presente (s) no útero. Todas as alterações celulares vieram associadas à neutrófilos, demonstrando processo inflamatório inespecífico.

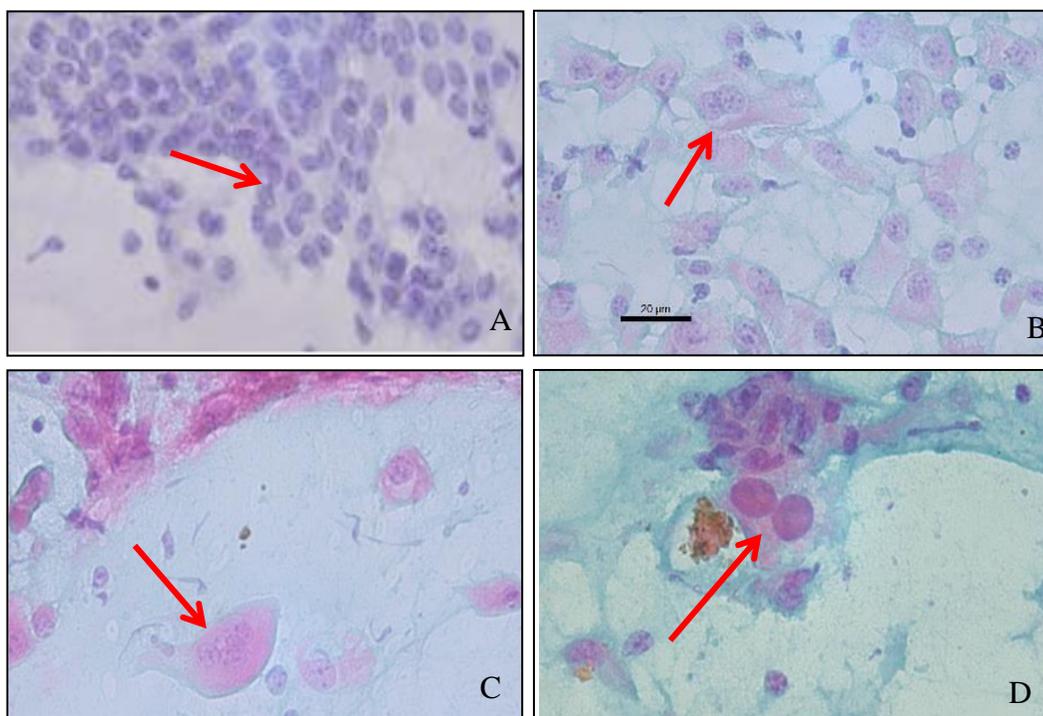


Figura 6 – Citologia. (A) Citologia normal. (B) Binucleação. (C) Multinucleação. (D) Cariomegalia. Coloração Papanicolau. 100x.

4.4 DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

O diagnóstico histopatológico utilizando a coloração HE demonstrou consenso ao exame de citologia. Em 60 vacas (75,0%) não houve alterações patológicas (Tab. 7) (Figs. 7 e 8). Em 20 vacas (25,0%) (Tab. 7) (Figs. 9 e 10) apresentaram endometrite inespecífica acompanhada de atipias celulares (cariomegalia, irregularidade na membrana nuclear, nucléolo proeminente, cromatina grosseira e desorganizada, presença de pleomorfismo celular, eosinófilos e neutrófilos), hiperplasia e úlceras.

Tabela 7 – Diagnóstico histopatológico

Diagnóstico histopatológico		
Descrição	Total	%
Sem Alterações Patológicas	60	75,0
Endometrite inespecífica	20	25,0
TOTAL	80	100,0

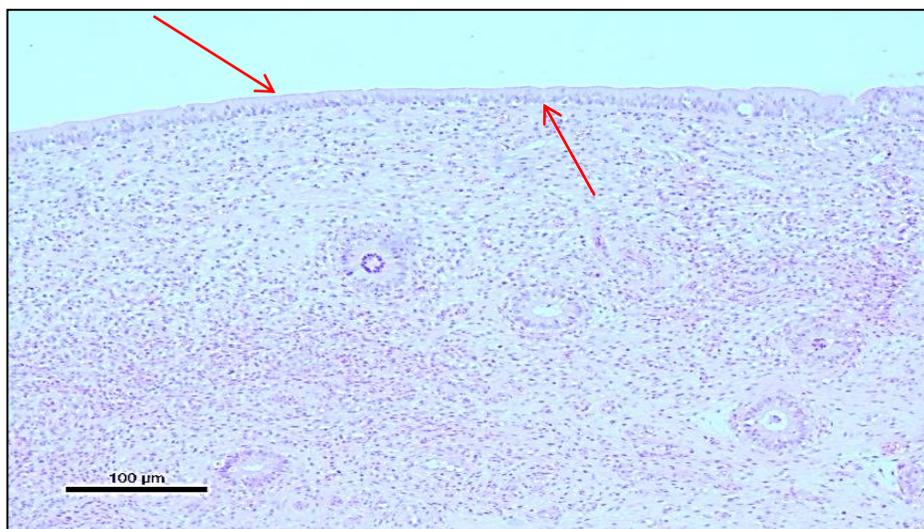


Figura 7 – Endométrio normal. HE. 40x.

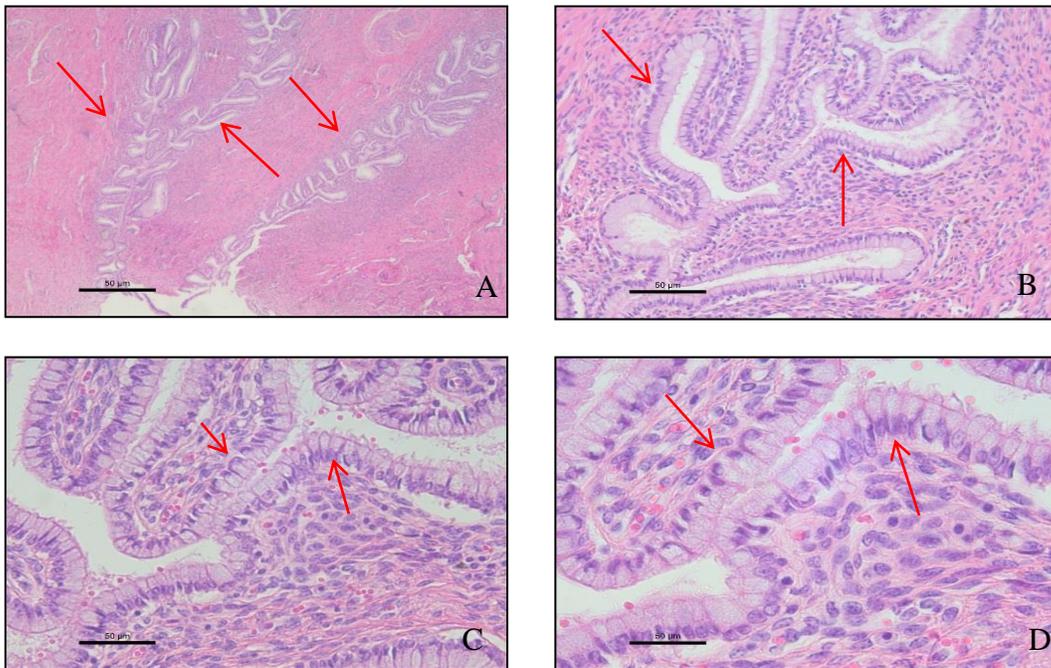


Figura 8 - Útero normal. O epitélio é simples e cuboide e tecido conjuntivo fibroso. (A)- HE.25x. (B)- HE. 40x.(C e D)- HE.100x.

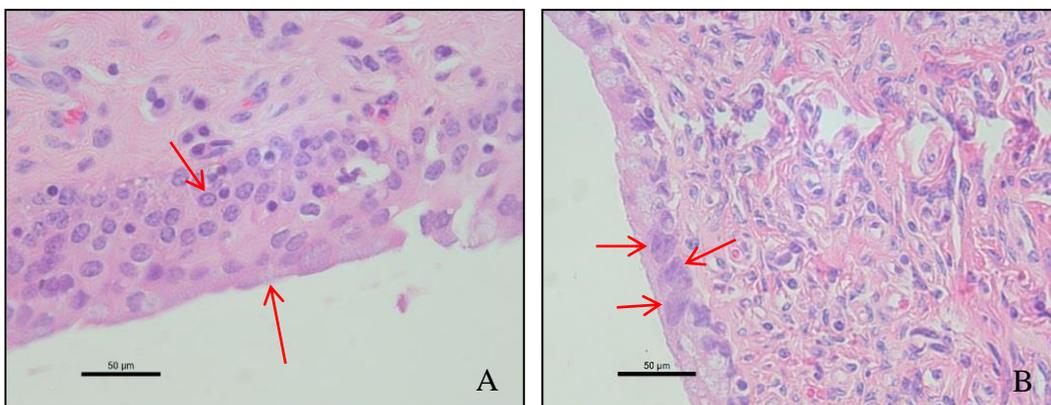


Figura 9 – Endométrio com alterações atípicas. (A) Endométrio com alterações atípicas. (B) O epitélio cuboide está hiperplásico, os núcleos apresentam nucléolo evidente, cariomegalia e irregularidade na membrana nuclear. H. E. 100x.

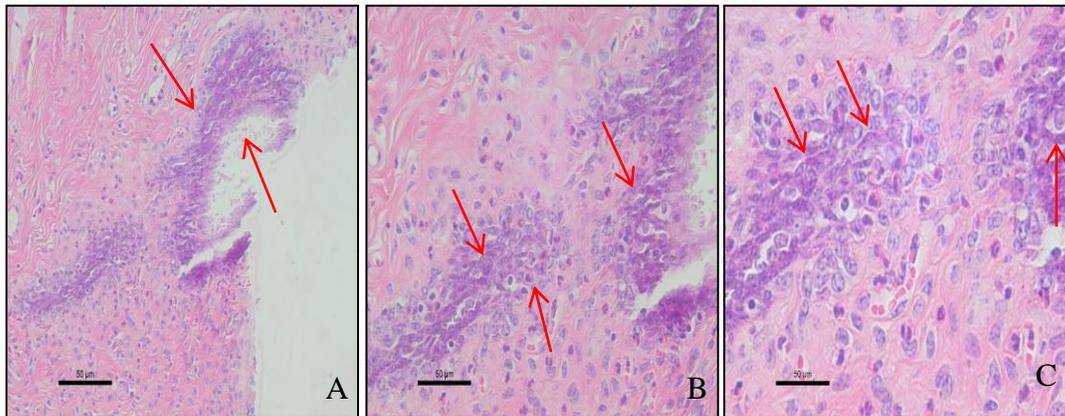


Figura 10 – Endométrio com alterações atípicas. (A) Inflamação intensa com presença de polimorfonucleares e formação de úlcera acompanhada de invasão celular do epitélio cuboide ao miométrio adjacente. H.E. 25x. (B) O epitélio está em desarranjo e com cariomegalia, membrana nuclear irregular, a cromatina está grosseira e em desarranjo, presença de eosinófilos e neutrófilos. H.E. 100x. (C) Nucléolo evidente. H.E. 100x.

4.5 DIAGNÓSTICO IMUNOHISTOQUÍMICO

Na IHQ, o biomarcador p16 não marcou os controles positivos, enquanto que o biomarcador ki-67 marcou a expressão nuclear no controle positivo.

Foram selecionadas para a pesquisa da Ki-67 apenas as 20 amostras que apresentaram atipia endometrial diagnosticada na citologia e confirmada na histologia. Destas, seis amostras (30,0%) foram negativas (Tab. 8) (Fig. 11) e 14 amostras (70,0%) foram positivas para Ki-67 marcando adenocarcinoma pela IHQ (Tab. 8) (Figs. 12, 13 e 14).

Tabela 8 - Diagnóstico de IHQ da Ki-67

Imunohistoquímica da Ki-67		
Resultados	Total	%
Positivas	14	70,0
Negativas	6	30,0
Total	20	100,0

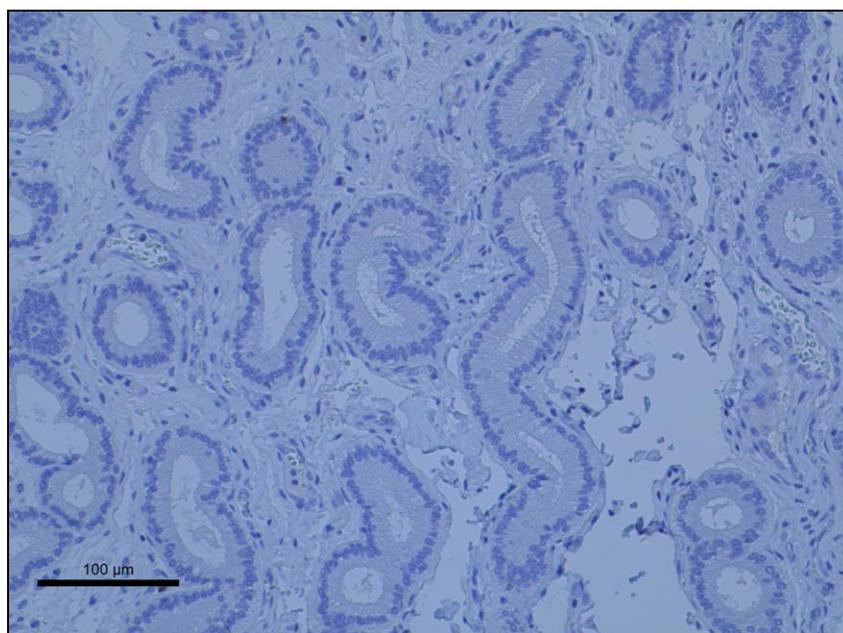


Figura 11- Endométrio normal na IHQ. Amostra negativo para a marcação por ki-67. IHQ. 40x.

Nas amostras marcadas por Ki-67, as alterações foram adenocarcinoma endometrial de padrão endometrióide com células agrupadas e sobrepostas, com cromatina de distribuição grosseira, pequenos nucléolos, células com aspecto em paliçada (Fig. 12), presença de vários focos de hiperplasia, binucleação e multinucleação (Fig. 13).

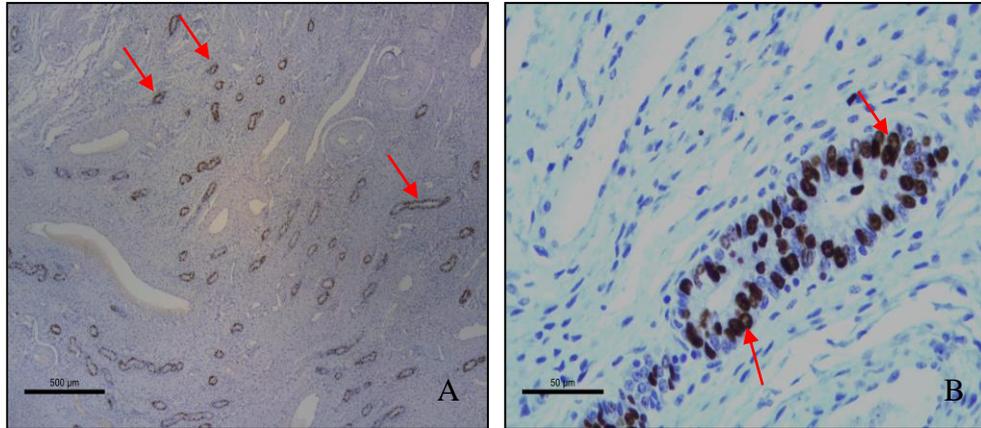


Figura 12 - Endométrio positivo para Ki-67. (A) Adenocarcinoma endometrial marcado por Ki-67. IHQ. 25x. (B) O adenocarcinoma apresenta alterações citopatológicas como cariomegalia, cromatina extremamente grosseira, presença de nucléolos, as glândulas endometriais estão comprometidas e hiperplásicas. IHQ. 100x

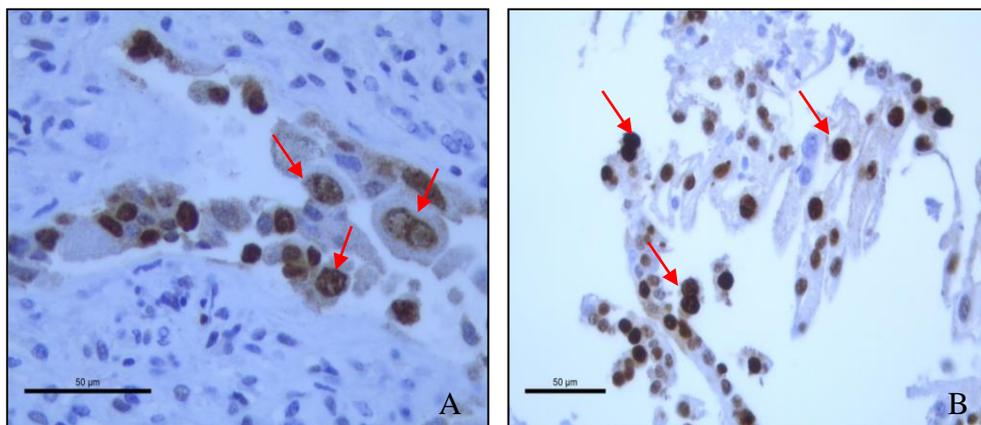


Figura 13 - Endométrio positivo para Ki-67. (A) Células endometriais com cariomegalia, binucleação e cromatina grosseira. (B) Células com cromatina está grosseira e os nucléolos evidentes. IHQ. 100x.

As células marcadas pelo Ki-67 acometeram todo o endométrio; as células apresentaram formas bizarras, tais como binucleação em formato de girino, características de células invasivas (Fig.14). Foi observado em lúmen de vasos sanguíneos, linfócitos marcados pela Ki-67 em endométrio (Fig. 15) e também próximo à cérvix uterina (Fig.16).

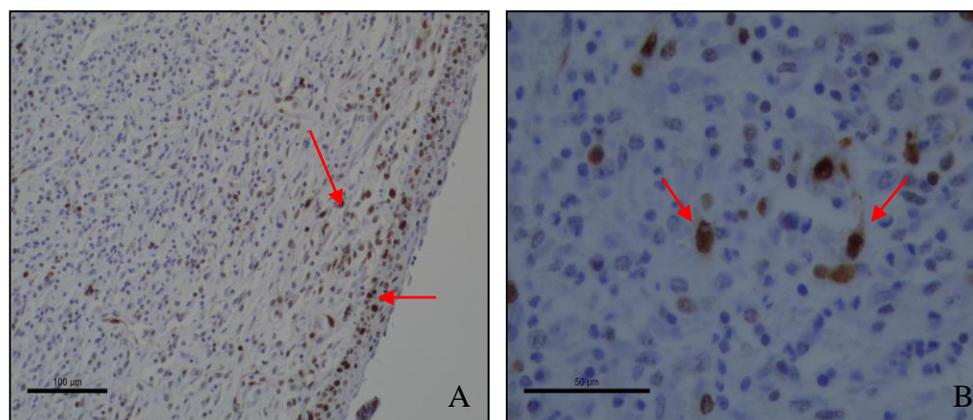


Figura 14 – Adenocarcinoma endometrial. (A) Células endometriais marcadas por Ki-67 acometendo todo endométrio. (B) Células endometriais em formas de girino com binucleação, membrana nuclear irregular e a cromatina densa. IHQ. 100x.

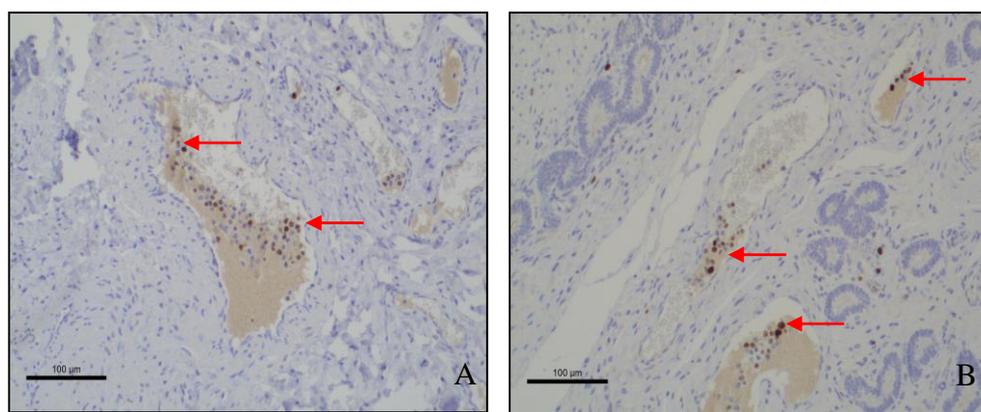


Figura 15 – Linfócitos marcados por Ki-67. (A) Linfócitos marcados por Ki-67 em lúmen de vaso sanguíneo. (B) Três vasos sanguíneos com linfócitos marcados por ki-67. IHQ. 100x.

As 14 amostras positivas para Ki-67 foram submetidas à IHQ com biomarcador do receptor de hormônio Estrogênico (RE) e todas foram positivas para esse marcador (Tab. 9). As células marcadas por RE apresentaram lesão de adenocarcinoma endometrial características, tais como cariomegalia e cromatina condensada, bem como membrana nuclear irregular (Figs. 17, 18 e 19), confirmando a presença do estrógeno no adenocarcinoma. As amostras positivas não marcaram linfócitos em lúmen de vasos.

Tabela 9 - Diagnóstico de IHQ de receptor de estrógeno (RE)

Imunohistoquímica de RE		
Resultados	Total	%
Positivas	14	100,0
Negativas	0	0
Total	14	100,0

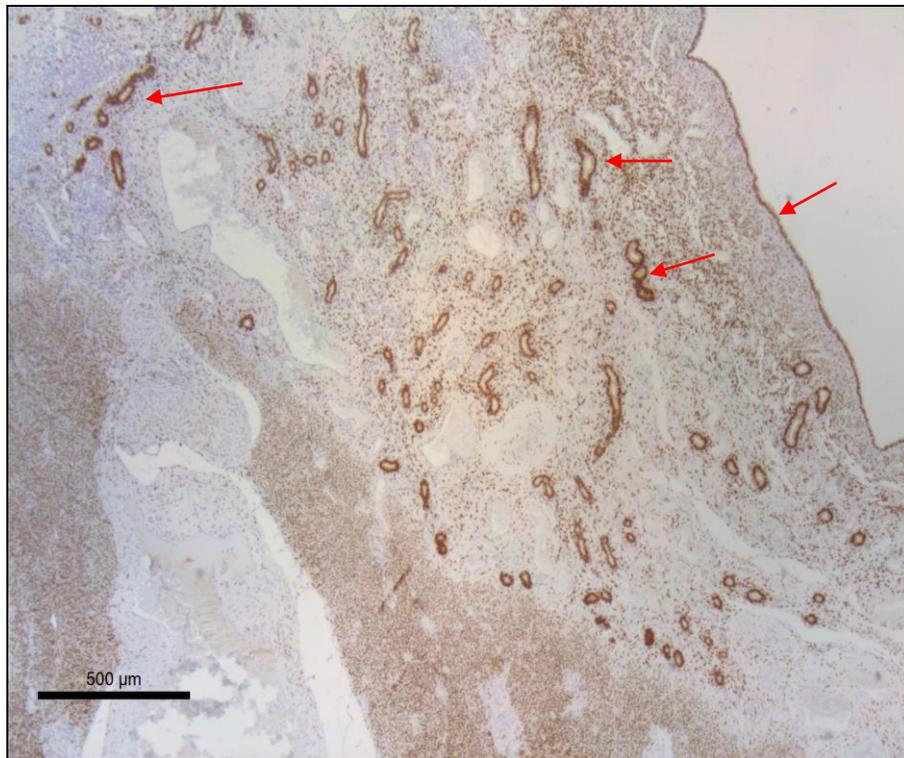


Figura 16 - IHQ de RE positivo. A imagem acima representa RE positiva em lesão de adenocarcinoma endometrial. IHQ. 25x.

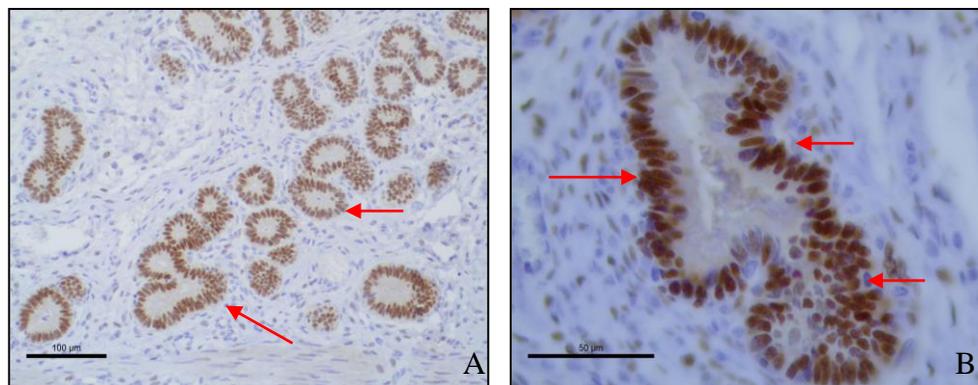


Figura 17 - IHQ de RE positivo. (A) Marcador de estrogênio na IHQ positivo em lesão de adenocarcinoma endometrial. (B) Nucléolos evidentes, cromatina grosseira e membrana nuclear irregular. IHQ. 100x.

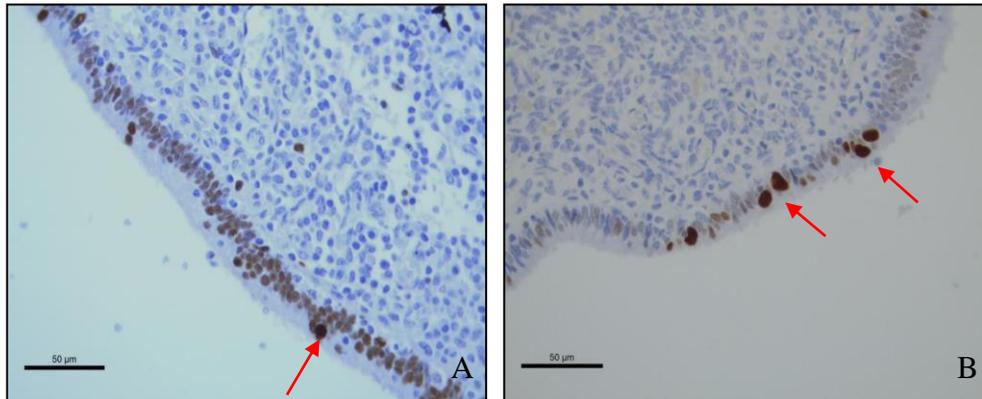


Figura 18 - IHQ de RE positivo. (A) Marcador de estrogênio na IHQ positivo para lesão de adenocarcinoma endometrial. (B) Cariomegalia e cromatina condensada, membrana nuclear irregular. IHQ. 100x.

4.6 DIAGNÓSTICO *nested-PCR*

As amostras de ovário, tuba uterina, corno uterino, corpo uterino, cérvix uterino e sangue total das 80 vacas foram submetidas à *nested-PCR* utilizando os *primers* Delta Epsilon F, Delta Epsilon R, FAP59 e FAP64 para o BPV e o resultado foi negativo. A figura 20 trata-se dos resultados da *nested-PCR* dos *primers* Delta Epsilon F e Delta Epsilon R, e a figura 21 dos *primers* FAP59 e FAP64 .

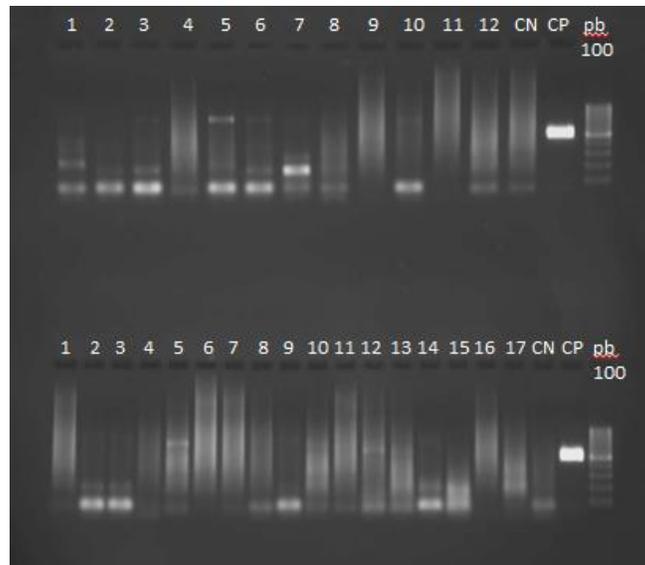


Figura 19 - *Nested-PCR primer* Delta Epsilon, com o tamanho de 430pb. Nas canaletas 1 a 17 estão representadas as amostras. Nas três últimas canaletas trata-se do controle negativo (CN), controle positivo (CP) e o marcador de 100 pares de base (pb).

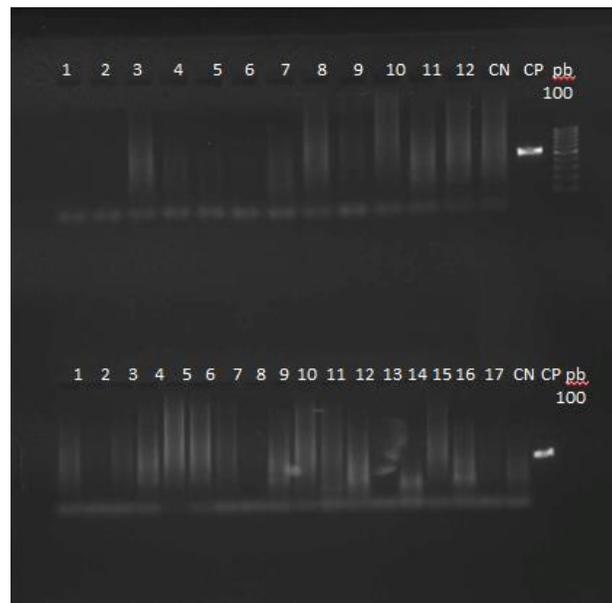


Figura 20 - *Nested-PCR primers* FAP, com o tamanho de 478 pb. Nas canaletas 1 a 17 estão representadas as amostras. Nas três últimas canaletas trata-se do controle negativo (CN), controle positivo (CP) e o marcador de 100 pares de base (pb).

A tabela 10 organiza todas as análises realizadas e os resultados obtidos no presente estudo. Observa-se que a análise clínica e macroscópica não foram suficientes para fechar o diagnóstico. O histopatológico e citológico revelaram a presença de atipias teciduais. A IHQ para marcadores Ki-67 e RE foram utilizados como provas confirmatórias, nos casos de atipia, para carcinoma endometrial. A *nested*-PCR não detectou o BPV nas amostras.

Tabela 10 – Diagnóstico do estado físico, macroscopia, citológico, histológico, IHQ p16 e Ki-67, Marcador de Estrógeno (RE) na IHQ e *nested*-PCR.

Estado físico, macroscopia, citológico, histológico, IHQ (p16, Ki-67, RE) e <i>nested</i>-PCR						
Diagnóstico	Positivo		Negativo		total	%
	total	%	Total	%		
Estado Físico	1	1,25	79	98,75	80	100,0
Macroscopia	8	10,0	72	90,0	80	100,0
Citológico	20	25,0	60	75,0	80	100,0
Histológico	20	25,0	60	75,0	80	100,0
IHQ p16	0	0	20	100,0	20	100,0
IHQ Ki-67	14	70,0	6	30,0	20	100,0
IHQ RE	14	100,0	0	0	14	100,0
<i>nested</i> -PCR BPV	0	0	80	100,0	80	100,0

5 DISCUSSÃO

É importante estudar patologias que acometem bovinos leiteiros, porque a produção de leite no Brasil tem crescido nos últimos anos, estimada em torno de 4,3% no período de 2000 a 2012, havendo registros de produção de leite em 555 microrregiões geográficas, das 558 existentes no país (IBGE, 2012). O presente estudo utilizou vacas abatidas em frigoríficos sob inspeção sanitária na Região do Vale do Paraíba, que se destaca pela maior concentração de produtores leiteiros no Estado de São Paulo (LEITE BRASIL, 2005/2006) (Fig. 2).

No presente estudo, foram coletados 80 úteros de vacas de aptidão leiteira na faixa etária de 3 a 5 anos. A avaliação clínica mostrou vacas em bom estado físico geral, apenas uma vaca apresentou papilomas em pele, e nenhuma apresentou papiloma em vulva. Mesmo considerando que vacas leiteiras jovens encaminhadas para o abatedouro são animais de descarte de rebanho por problemas produtivos e reprodutivos, não foi possível obter o histórico clínico destes animais. Não foram observados sintomas clínicos (corrimento); em geral, as secreções genitais são totalmente reabsorvidas pela mucosa do sistema reprodutivo após o parto, sendo o único sintoma clínico a repetição do cio. Acredita-se que cerca de 10% a 20% dos animais que repetem o cio sem causa aparente são portadores de endometrite (SANTOS; VASCONCELOS, 2006).

Foi possível avaliar na macroscopia, que quatro vacas (5%) apresentaram metrite decorrente da retenção de placenta, acompanhada de necrose, cicatrização, edema, descarga uterina de coloração achocolatada e odor fétido. Entende-se por metrite a inflamação de todas as camadas uterinas, e acomete os animais alguns dias após o parto. Foi possível notar que outras quatro vacas (5%) apresentaram endometrite na mucosa da cérvix e corpo uterino, estando a mucosa edemaciada, com superfície rugosa e presença de fibrina, tendo comprovado por microscopia óptica é comum a presença de neutrófilos e um pequeno espessamento endometrial (McGAVIN; ZACHARY, 2007).

Na citologia da cérvix uterina, de 80 esfregaços citológicos analisados, atipias foram encontradas em 20 vacas (25%), tais como cariomegalia, binucleação e multinucleação, acompanhadas de neutrófilos. Em seres humanos, o Sistema Bethesda de classificação citológica cérvico-vaginal considera que atipias celulares de significado indeterminado são

caracterizadas por cariomegalia, binucleação e multinucleação (ASC, 2001), indicando uma patologia a ser investigada. Ressalta-se que semelhantes atipias também foram observadas nas vacas estudadas. Segundo Santos (1975), a endometrite bovina pode ser causada por coliformes fecais, estafilococos, *Vibrio foetus* e *Trichomonas foetus*, dentre outros agentes, que causam inflamação.

A avaliação microscópica dos tecidos foi realizada por comparação de tecido normal com lesionado. Segundo BACHA; BACHA (2003), o epitélio normal que reveste a cérvix uterina bovina possui células cuboidais a poliédricas, com citoplasma abundante e eosinofílico, e a submucosa é uniforme e fibrilar, com limites moderadamente distintos entre mucosa e submucosa; as células normais de revestimento da mucosa uterina apresentam núcleo redondo, com leve variação da forma e tamanho, localização central e cromatina uniforme. As alterações teciduais inflamatórias, degenerativas, necróticas, circulatorias, hiperplasia, hipertrofia e anaplasia foram descritas segundo literatura de referência em anatomia patológica veterinária (JONES; HUNT; KING, 2000; McGAVIN; ZACHARY, 2007).

Foram diagnosticadas por histologia 80 vacas, das quais 20 (25%) apresentaram endometrite inespecífica e apresentaram as seguintes alterações: cariomegalia, hiperplasia epitelial, binucleação e infiltrado inflamatório neutrofílico. Estas alterações de endometrite foram encontradas na cérvix, corpo uterino e corno uterino. Em tuba e ovário não foram encontradas alterações histopatológicas. Através do diagnóstico histopatológico, foi possível concluir que o processo inflamatório observado era localizado no útero. Processos inflamatórios do trato genital feminino são, em sua grande maioria, de origem infecciosa, e geralmente causados por manejo reprodutivo inadequado, principalmente os relacionados à cobertura, auxílio obstétrico e acompanhamento do puerpério (GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005).

Nas amostras positivas onde houve correlação de citologia e histologia para atipias celulares e endometrite inespecífica, investigou-se um possível agente oncogênico associado a uma lesão. Realizou-se a IHQ para o marcador p16, por ser utilizado para detectar atividade viral pré-lesional pelo PV humano (INCA, 2006). Estudos da p16 em região de colo uterino afirmaram que, em humanos, esse marcador é de alta confiabilidade

para diagnosticar a presença do HPV (GUO et al., 2011). Todas as amostras de cérvix uterina e corpo uterino das vacas foram negativas para este marcador.

A origem da atipia citológica continuou sendo investigada, utilizando por IHQ o marcador para a proteína Ki-67, que avalia expressão mitótica. Esta é a forma mais confiável para a avaliação do índice mitótico em humanos, visando determinar um fator prognóstico de lesões pré-cancerígenas e cancerígenas (GARZETTI et al., 1995). Esta análise marcou intensamente o epitélio endometrial e linfócitos presentes no corpo uterino das vacas, caracterizando adenocarcinoma endometrial e demonstrando que a Ki-67 pode ser usada para avaliar índice mitótico e lesões cancerígenas em bovinos. Porém, este biomarcador não marcou expressivamente o epitélio de revestimento da cérvix uterina pelo fato de que nesta região antômica não havia lesão tecidual atípica, porém os linfócitos presente no lúmen de vasos sanguíneos em corpo uterino e próximos da cérvix uterina foram marcados pela Ki-67. O adenocarcinoma presente no corpo uterino das vacas apresentou padrão de marcação imunohistoquímica pela ki-67 e morfológico semelhante ao descrito por Xavier (2010) em mulheres (ANEXOS II e III), mostrando a possibilidade do uso de bovinos como modelo experimental para esta patologia.

Estudos do carcinoma endometrial em humanos utilizaram na IHQ a associação do biomarcador ki-67 e receptores hormonais de estrógeno (RE), mostrando a importância dessas moléculas no desenvolvimento desta patologia (MORIN, 2005). A expressão do RE na IHQ é encontrada principalmente em carcinoma endometrióide humano em estágio avançado (BONFITTO, 2002).

No presente trabalho, os 14 adenocarcinomas marcados pela Ki-67 foram submetidos à IHQ para RE e resultaram positivos, revelando a participação do estrógeno na carcinogênese, devendo ser considerado como um dos fatores de risco para o desenvolvimento tumoral em útero bovino. Em vacas, a reprodução assistida busca aumentar os índices de fertilidade utilizando a hormonioterapia para induzir e sincronizar o cio, e promover superovulação (EMBRAPA, 2002). São utilizados hormônios injetáveis comerciais, tais como o Benzoato de Estradiol, Citrato de Estradiol, Valerato de Estradiol e progesterona utilizadas na forma de dispositivos intra-vaginais, implante auricular e injetáveis entre outros (SALISTRE, 2017). O uso de estradiol para induzir as vacas ao estro deve sempre ser usado com cautela, pois não existe estudos que avaliem as doses de

segurança para a utilização desses fármacos em vacas. Em humanos, os riscos da estrogenerapia e seus efeitos colaterais parecem estar relacionados às doses elevadas de contraceptivos orais (RANG et al., 2001) por isso o presente trabalho analisou a presença de estrógeno através de biomarcador pela IHQ no útero das vacas com lesões de adenocarcinoma endometrial. Segundo o Ministério da Saúde (2016), sabe-se que, entre as causas de carcinoma endometrial em humanos, a terapia hormonal utilizando o estrógeno sem associação da progesterona é o fator de risco mais preocupante, pois esse tipo tumoral aproveita a ausência do hormônio progesteronal, que tem a função de proteger o endométrio contra o crescimento anormal. A exata causa e origem do adenocarcinoma endometrial em mulheres ainda é desconhecida (INCA, 2016).

Um dos maiores problemas relacionados a IA no Brasil refere-se à dificuldade na detecção do estro (OLIVEIRA, 2007). Por essa dificuldade na detecção de estro em gado leiteiro, a maioria dos produtores usa a IATF no rebanho a fim de explorar ao máximo o potencial reprodutivo do rebanho. Para que se tenha uma produção eficaz com o uso da IA ou em qualquer manejo reprodutivo, é necessário avaliar a sanidade do animal e decidir se está apto ou não para esse procedimento (NUNES, 2017). Desta forma, podemos prevenir não só o adenocarcinoma endometrial, pelo excesso no uso de estrógeno, mas também outras patologias ligadas a manipulação hormonal em vacas, que podem reduzir a vida reprodutiva desses animais, causando impacto econômico.

O uso da IATF só é justificável se o rebanho tiver pastagem de boa qualidade, se os animais estiver recebendo sal mineral e água à vontade, para que vacas apresentem alto índice reprodutivo com a utilização hormonal. Outros fatores que podem interferir na IA são o estresse térmico e a falta de higiene no plantel (GODOI et al., 2010). Ou seja, antes de introduzir no plantel a IATF, é necessário avaliar o ambiente, os fatores de estresse e a sanidade do rebanho.

Atualmente, existem vários protocolos de IATF utilizados em bovinos (GOTTSCHELL et al., 2009). Os protocolos já existentes exigem grande investimento do produtor e corpo técnico preparado para esse fim, e em muitas situações os resultados são limitados, pois em alguns casos as taxas de prenhez são baixas em comparação à IA convencional (PURSLEY et al., 1997), não justificando em ganhos produtivos o investimento do pecuarista em fármacos de alto custo.

Tratamentos para induzir novilhas à puberdade foram amplamente descritos na literatura (RODRIGUES et al., 2014). O uso de estradiol se mostrou efetivo junto a outros fármacos para indução da primeira ovulação em novilhas pré-púberes (RASBY et al., 1998). No presente estudo, as vacas avaliadas tinham idade entre 3 a 5 anos; em 80 animais abatidos, 14 (17,5%) apresentaram adenocarcinoma uterino, valor elevado para a ocorrência de neoplasia maligna acometendo o trato reprodutivo. A presença de estrógeno em novilhas vem encurtando a vida reprodutiva desses animais, esse tumor fragiliza o útero e pode causar infecções secundárias, das quais após tratamento a base de antibióticos resultarão em recidiva, devido à presença do adenocarcinoma endometrial.

Fármacos à base de estrógeno são utilizados em técnicas para super ovular novilhas. No estudo feito por Bacelar et al. (2010), novilhas Nelore foram tratadas com progesterona e benzoato de estradiol injetável, concluindo que esse protocolo foi eficaz na obtenção de oócitos. RANG et al. (2001) utilizaram estrógeno em tratamento de reposição hormonal em mulheres e mostrou ser fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma endometrial. Portanto, a presença de estrógeno avaliada pela IHQ nas vacas comprovou ser o estrógeno também fator de risco para o desenvolvimento do adenocarcinoma endometrial.

O método Ovsynch desenvolvido para a sincronização do estro e ovulação permite a IATF sem a necessidade de observação de estro, e não utiliza estrógeno. O tratamento consiste na administração de fármacos a base de prostaglandina e de GnRH (WOLFENSON et al., 1994; PURSLEY et al., 1997). Esse protocolo é mais seguro a saúde reprodutiva das vacas, tendo em vista que o presente trabalho confirmou ser o estrógeno um fator que contribui para o desenvolvimento do adenocarcinoma endometrial, portanto, mais protocolos que não utilizam estrógenos, como o Ovsynch, devem ser desenvolvidos para o aumento da vida reprodutiva de vacas.

Gottschall et al. (2012) concluíram que a idade para o primeiro acasalamento não exerceu influência sobre a taxa de prenhez na IATF e prenhez final em novilha de corte. O protocolo OvSynch associado a um implante de progesterona se mostrou superior nos resultados de prenhez à IATF quando comparado ao protocolo PEPE, que usa progesterona, estrógeno, prostaglandina e estrógeno. Se temos a nossa disposição outras formas de aplicação da IATF com ausência de estrógeno, esses protocolos podem ser uma boa opção, pois auxiliariam na sanidade e longevidade reprodutiva das matrizes.

No presente estudo, todas as amostras das vacas (sangue total, ovário, tuba uterina, corno uterino, corpo uterino e cérvix uterina) foram negativas para a *nested*-PCR utilizando quatro diferentes *primers* do gene gene L1 para BPV (Delta Epsilon F/Delta Epsilon R e FAP59/FAP64). Estes *primers* foram inicialmente desenhados para detecção de HPV, porém têm sido aplicados em estudos que abordam a diversidade do BPV em bovinos. Delta Epsilon F/Delta Epsilon R e FAP59/FAP64 também foram utilizados na pesquisa de BPV presente em pele e mucosa de bovinos, por outros pesquisadores (FORSLUND et al., 1999; MAEDA et al., 2007). Araldi (2014) utilizou os *primers* Delta Epsilon e FAP59/FAP64 para pesquisa de BPV em papilomas cutâneos bovinos, com a finalidade de obter um banco de BPV, tendo encontrado que os *primers* específicos para BPV-1 e BPV-2 foram mais sensíveis do que os degenerados na identificação do BPV, porém os específicos apresentavam a desvantagem de não detectar novos tipos virais, podendo haver a possibilidade de ocorrência de outro genotipo de BPV não identificado por estes *primers*. O fato da *nested*-PCR ter resultado negativo, pode ser devido ao fato de que, em tecidos neoplásicos, como exemplo em carcinoma de bexiga urinária, o BPV esteja integrado ao genoma da célula hospedeira e apresente baixos níveis de detecção viral (CARVALHO et al., 2003). Por outro lado, o vírus controle utilizado na *nested*-PCR foi extraído de papiloma cutâneo bovino, encontra-se em fase episomal e apresenta títulos elevados, facilitando sua detecção. Também torna-se necessário desenhar *primers* para detecção de BPV a partir de sequências de nucleotídeos destes vírus, e não somente dos HPV.

No Japão, Ogawa et al. (2004) identificaram mais 10 supostos tipos de BPV, demonstrando que, a exemplo do HPV, a diversidade de tipos do BPV também pode ser bastante ampla. Portanto, esse número pequeno de tipos virais conhecidos parece ser falha metodológica na determinação dos tipos presentes em infecções, e não da inexistência de diversidade antigênica e molecular em BPV (ARAUDI, 2014). No Brasil, independentemente do nível de tecnificação da exploração pecuária, a infecção pelo BPV pode ser encontrada em rebanhos bovinos de corte e, principalmente, nos de aptidão leiteira em praticamente todo o país. Apesar da alta frequência da infecção, a determinação dos tipos virais circulantes nos rebanhos ainda é bastante esporádica (CLAUS et al., 2007).

As diferentes técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresentam uma discrepância nas taxas positivas quando utilizadas em diferentes amostras clínicas. A

padronização da técnica *nested*-PCR validou o controle positivo em um papiloma cutâneo bovino, genotipificado como BPV-1. A extração de DNA das amostras de tecido e sangue total utilizaram kit de extração, reduzindo erros do manipulador. Utilizou-se *primers* de região conservada e não conservada do gene L1.

Em vacas, é possível que o BPV seja inserido no útero por meio de inseminação artificial, tendo em vista que não é realizado o controle sanitário obrigatório do BPV em partidas de sêmen bovino industrializado. Silva (2008) detectou DNA do BPV em sêmen bovino fresco e congelado industrializado. Em humanos, o sêmen é reconhecida via de eliminação do HPV e proíbe-se que portadores seja doadores (RINTALA et al., 2004).

Tendo em vista que o BPV não foi detectado pela *nested*-PCR no trato genital, sugere-se que outros fatores de risco possam estar associados às lesões identificadas, tendo em vista que os animais abatidos como descarte eram jovens e estavam em idade reprodutiva, sendo possível que a infertilidade tenha sido a causa do descarte. O agronegócio do leite bovino leva em consideração o aumento da produtividade leiteira por animal (IBGE, 2012). Por este motivo, a fêmea bovina é explorada em seu máximo potencial reprodutivo, a fim de gerar um bezerro ao ano e, conseqüentemente, entrar todo ano em lactação. Do ponto de vista zootécnico, esse objetivo é alcançado por meio de manejo reprodutivo racional, utilizando as biotécnicas da reprodução, dentre as quais a utilização de hormônios que são fatores de risco oncogênicos, e não devem ser utilizados de forma discriminada.

O presente trabalho serve de referência para estudos de citologia oncológica uterina bovina e histopatologia, bem como é inovador ao validar o uso de IHQ com biomarcadores ki-67 e RE no diagnóstico de adenocarcinoma uterino bovino, uma vez que não existe na literatura científica fonte de referência para consulta que sirva de comparação, além da humana.

6 CONCLUSÃO

- O adenocarcinoma endometrial em fêmeas bovinas abatidas em frigoríficos mostrou ser uma patologia de ocorrência elevada 17,50% (14/80), e está associada à infertilidade e descarte prematuro de matrizes em idade reprodutiva.
- A citologia oncótica utilizando a técnica de coloração de Papanicolau demonstrou concordância com a histopatologia de HE, a exemplo do padrão diagnóstico utilizado em humanos para rastreamento de lesões em útero.
- A imunohistoquímica utilizando marcador anticorpo anti-proteína Ki-67 pode ser utilizada no diagnóstico de adenocarcinoma endometrial uterino bovino, sugerindo o prognóstico, a exemplo do utilizado em humanos.
- A imunohistoquímica utilizando marcador anticorpo anti-receptor de estrógeno demonstrou que este hormônio é um fator causal para o desenvolvimento de adenocarcinoma endometrial uterino bovino, a exemplo do utilizado em humanos.
- Na amostragem avaliada, a *nested*-PCR utilizando os *primers* FAP59/ FAP64 e Delta Epsilon F/ Delta Epsilon R para BPV não detectou o agente em útero saudável e nem em útero com lesões histológicas inflamatórias inespecíficas e tumorais.
- A fêmea bovina mostrou ser um modelo experimental para a pesquisa de adenocarcinoma uterino.

REFERÊNCIAS

AFIP. INSTITUTO DE PATOLOGIA DE LAS FUERZAS ARMADAS DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMERICA. **Métodos Histotecnológicos**. In: PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. (Eds.). Washington: Registro de Patología de los Estados Unidos de América, 1995. 280p.

ARALDI, R. P. **Isolamento e identificação do grupo experimental de bovinos para a obtenção de um banco de vírus**. 132 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciência Biomédicas. Programa de Pós- Graduação. Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Area de concentração: Biotécnoologia. Linha de pesquisa: Oncogênese viral. São Paulo, 2014.

ASC. AMERICAN SOCIETY OF CITOPATHOLOGY. **NCI Bethesda System**. 2001. Available from: <<http://nih.cytopathology.org/>>. Acesso em: 8 jun. 2016.

BACELAR, D.; CONSTANTINO, M. M.; PADILHA, L. C.; BARREIRO, T. R. R.; MARCONDES, M. S. Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos Taurus indicus*) tratadas com progesterona injetável e benzoato de estradiol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 163-171, 2010.

BACHA, W. J.; BACHA, L. M. (Eds.). **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. 457 p.

BLOCH, N.; SUTTON, R. H.; BREEN, M.; SPRADOBROW, P.B. Identification of papillomaviruses in scrapings from bovine warts by use of the polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, v. 21, n. 1, p. 63-68, 1997.

BONFITTO, V. L. L. **Expressão do p53, receptores de estrógeno e progesterona em material de curetagem diagnóstica para adenocarcinoma endometrial a sua correlação com os dados morfológicos e o estágio da doença, em histerectomias**. 85 f.

Dissertação (Mestrado) – Pós- Graduação em, Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Área de Anatomia Patológica. Campinas - São Paulo, 2002.

BOOY, .F; RODEN, R. B. S; GREENSTONE, H. L.; SCHILLER, J. T.; TRUS, B. L. Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 281, p. 95-106, 1998.

CAMARGOS, A.F.; HUGO DE MELO, V. Doenças sexualmente transmissíveis. In: _____ **Ginecologia ambulatorial**. Belo Horizonte: Coopamed, 2001. p. 397-400.

CAMPOS, S. R. C.; MELO, T. C.; ASSAF, S.; ARALDI, R. P.; MAZZUCHELLI, J. S.; SIRCILLA, M. P.; CARVALHO, R. F.; ROBERTO, F.; BEÇAK, W.; STOCCO, R. C. Chromosome aberrations in cells infected with bovine papillomavirus: comparing cutaneous papilloma, esophagus papilloma, and urinary bladder lesion cells. **ISRN Oncology**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

CAMPOS, S. R. C.; TRINDADE, C.; FERRAZ, O.P.; GIOVANNI, D. N. S.; LIMA, A. A.; CAETANO, H. V. A.; CARVALHO, R. F.; BIRGEL, E. H.; DAGLI, M. L. Z.; MORI, E.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; BEÇAK, W.; STOCCO, R. C. Can established papilloma cells harbor bovine papillomavirus? **Genetics and Molecular Research**, v. 7, p. 1119-1126, 2008.

CARVALHO, C.; FREITAS, A. C.; BRUNNER, O.; GÓES, L. G. B. Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, (Supl.1), p. 82-84, 2003.

CARVALHO, J. J. M.; OYAKAWA, N. **I Consenso Brasileiro de HPV**. BG Cultural, 2000. 142p.

CATROXO, M. H. B.; MARTINS, A. M. C. R. P. F.; PETRELLA, S.; SOUZA, F.; NASTARI, B. D. B. Ultrastructural Study of Bovine Papillomavirus During

Outbreaks in Brazil. **International Journal of Morphology**, v. 31, n. 2, p. 777-784, 2013.

CLAUS, M. P.; VIVIAN, D.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A. A. Análise filogenética de papilomavírus bovino associado com lesões cutâneas em rebanhos do Estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 314-318, 2007.

CLAUS, M. P.; LUNARDI, M.; ALFIERI, A. A.; OTONEL, R. A. A.; FERRACIN, L. M.; FUNGARO, M. H. P.; ALFIERI, A. F. A Bovine Teat Papilloma Specimen Harboring *Deltapapillomavirus* (BPV-1) and *Xipapillomavirus* (BPV-6) Representatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, Special Number, p. 87-91, 2009.

CÔRTEZ, J. A. Indicadores da Ocorrência de Doenças em Populações. In: _____ **Epidemiologia, Conceitos e Princípios Fundamentais**. São Paulo: Varela, 1993. p.155.

DA SILVA, F. R. C.; DAUDT, C.; STRECK, A. F.; WEBER, M. N.; LEITE FILHO, R. V.; DRIEMEIER, D.; CANAL, C. W. Genetic characterization of Amazonian bovine papillomavirus reveals the existence of four new putative types. **Virus Genes**, v. 55, n. 1, p. 77-84, 2015.

DE VILLIERS, E. M.; FRAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNHARD, H. U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Journal of Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

DOORBAR, J. The papillomaviruses life cycle. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 32, p7- 15, 2005.

EMBRAPA. **Nelore: Base genética e evolução seletiva no Brasil**. Planaltina: Embrapa, 2002. 50 p.

FERNANDES, J. V.; ARAÚJO, J. M. G.; FERNANDES, T. A. A. M. Biology and natural history of human papillomavirus. **Open Access Journal of Clinical Trial**, v. 5, p. 1-12, 2013.

FERRARO, C.; CANEDO, M.; OLIVEIRA, S.; CARVALHO, M.; DIAS, E. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associada. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, 451-459, 2011.

FINLAY, M.; YUAN, Z. Q.; MORGAN, I.; CAMPO, M. S.; NASIR, L. Equine sarcoids: Bovine Papillomavirus type 1 transformed fibroblasts are sensitive to cisplatin and UVB induced apoptosis and show aberrant expression of p53. **Biomed Central, Veterinary Research**, 2012. Disponível em: <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/1297-9716-43-81>. Acesso em: 10 set. 2016.

FORSLUND, O.; ANTONSSON, A.; NORDIN, P.; STENQUIST, B.; HANSSON, B.G. A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumors and normal skin. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2437-2443, 1999.

FREITAS, A. C.; CARVALHO, C.; BRUNNER, O.; BIRGEL-JR, E. H.; DELLA LIBERA, A. M. M. O.; BENESI, F. J.; GREGORY, L.; BEÇAK, W. SANTOS, R.C.S. Viral dna sequences in peripheral blood and vertical transmission of the vírus: a discussion about BPV-1. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p 76-78, 2003.

GARZETTI, G. G.; CIAVATTINI, A.; LUCARINI, G.; GOTORI, G.; DE NICHOLAS, M.; MUZZIOLI, M.; FABRIS, N. HPV DNA positivity and natural killer cell activity in the clinical outcome of mild cervical dysplasia: integration between virus and immune system. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 39, n. 2, p. 130- 135, 1995.

GODOI, C. R.; SILVA, E. F. R.; PAULA, A. P. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovino de corte. **PUBVET**, Londrina, v. 4, n. 14, ed. 119, art. 807, 2010.

GOTTSCHALL, C. S.; SILVA, L. R. Resposta reprodutiva de novilhas de corte aos dois a três anos de idade submetidas a diferentes protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF). **Veterinária em Foco**, v. 10, n.1, p. 16-25, 2012.

GOTTSCHALL, C. S.; BITTENCOURT, H. R.; MATTOS, R. C.; GREGORY, R. M. Antecipação da aplicação de prostaglandina, em programa de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.4, p. 970-979, 2009.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G. **Patologia e Clínica da Reprodução dos Animais Mamíferos Domésticos: Ginecologia**. São Paulo: Editora Varela, 2005. 551 p.

GUO, M.; BARUCH, A. C.; SILVA, E. G.; JAN, Y. J.; LYNE.; SNEIGE, N.; DEAVERS, M. T. Efficacy of p16 and ProEx immunostaining in the detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 135, n. 2, p. 212-220, 2011.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Ruler for making human tumor cells. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 20, p. 1593-1603, 2002.

HATAMA, S.; NOBUMOTO, K.; KANNO, T. Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 158-163, 2008.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. **Human Papillomaviruses**, v. 90. 2007. 670 p.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sistema de recuperação de informações**. Brasília, 2012. 68 p.

ICTV. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. 2014. Disponível em: < http://www.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-official/4849.aspx>. Acesso em: 8 Fev. 2015.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Nomenclatura Brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2006. 56 p.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Oncologia. Manual de Bases Técnicas**. 23. Ed. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Regulação, Avaliação e Controle e Coordenação-Geral de Sistemas de Informação, 2016. 137 p.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. NEEDS. **Patologia Veterinária**. 1^a. ed. Brasileira. Barueri: Editora Manole, 2000. 1415 p.

KANODIA, S.; FATHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets**, v. 7, p. 79-89, 2007.

KEY, M. **Immunohistochemical staining methods**. 4th. ed. Carpinteria: DAKO, 2006. 174 p.

LEITE BRASIL, **Levantamento de dados para Identificação do Perfil do Produtor de Leite Paulista e Adesão ao Programa Nacional de Qualidade do Leite**, 2005/2006.

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

LUNARDI, M.; DE ALCÂNTARA, B. K.; OTONEL, R. A. A.; RODRIGUES, W. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Bovine papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 2167- 2171, 2013.

MAEDA, Y.; SHIBAHARA, T.; WADA, Y.; KADOTA, K.; KANNO, T.; UCHIDA, I.; HARTAMAS. An outbreak of test papillomatosis in cattle caused by bovine papiloma vírus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. **Veterinary Microbiology**, v. 121, p. 242-248, 2007.

MANGLENNON, G. A.; DOORBAR, J. The biology of papillomavirus latency. **The Open Virology Journal**, v. 6, p. 190-197, 2012.

McBRIDE, A. A.; SAKAKIBARA, N.; STEPP, W. H.; JANG, M. K. Hitchhiking on host chromatin: how papillomaviruses persist. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 820-825, 2012.

McGAVIN, M.; ZACHARY, J. F. (Eds.). **Pathologic basis of veterinary diseases**. 4th ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. p. 1476.

MELO, T. C.; CARVALHO, R. F.; MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J.; DINIZ, N.; VASCONCELOS, S.; ASSAF, S. L. M. R.; ARALDI, R. P.; RUIZ, R. M.; KERKIS, I.; BEÇAK, W.; STOCCO, R. C. Phylogenetic classification and clinical aspects of a new putative Delta papillomavirus associated with skin lesions in cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 2, p. 2458-2459, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA-EXECUTIVA, SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. **Glossário temático: fatores de proteção e de risco de câncer**. 2016. 60 p.

MORIN, P. J. Claudin proteins in human cancer: Promising new target for diagnosis and therapy. **Cancer Research**, v. 65, n. 21, p. 9603-9606, 2005.

MUNDAY, J. S.; HANLON, E. M.; HOWE, L.; SQUIRES, R. A.; FRENCH, A. F. Feline cutaneous viral papilloma associated with human papillomavirus type 9. **Veterinary Pathology**, v. 66, n. 6, p. 924-927, 2007.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F.; SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 518-527, 2003.

MYLIUS, L. C. Expressão imuno-histoquímica de P16^{INK4A}, K167 e receptores de **estrogênio e progesterona em lesões do colo uterino, sua associação com infecção pelo papilomavírus humano e seus correlatos epidemiológicos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Faculdade de Medicina. Tese de Doutorado em Ciências Médicas, 2008.

NAKAGAWA, J. T. T.; SCHLRMER, J.; BARBLERL, M. Vírus HPV e câncer do colo do útero. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, v. 63, n. 2, p. 307-311, 2010.

NUNES, P. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE LIMOUSIN. **Inseminação Artificial em Tempo Fixo - IATF**. Disponível em: <<http://www.limousin.com.br/page/artigos/vendo.asp?ID=130>>. Acesso em: 26 abr. 2017.

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

OLATUNBOSUN, O.; DENEER, H.; PIERSON, R. Human papillomavirus DNA detection in sperm using polymerase chain reaction. **Obstetrics & Gynecology**, v. 97, n. 3, p. 357-360, 2001.

OLIVEIRA, D. J. G. C. **Inseminação Artificial em Tempo Fixo: Uma biotecnologia a serviço do empresário rural**. 2007. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_4/inseminação/index.htm>. Acesso em : 24 abr. 2017.

OLIVEIRA, M. L. C. S.; MOTA, A. R. C.; VIERO, E. M. **Citotecnologia – Manual de normas técnicas**. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp), Laboratório de Citologia, Departamento de Patologia, 2000. 24 p.

PAPANICOLAOU, G. N. A New Procedure for Staining Vaginal Smear. **Science**, v. 95, n. 2469, p. 438-439, 1942. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17842594>. Acesso em: 13 set. 2016.

PATHANIA, S.; DHAMA, K.; SAIKUMAR, G.; SHAHI, S.; SOMVANSI, R. Detection and quantification of bovine papilloma virus type 2 (BPV-2) by real-time PCR in urine and urinary bladder lesions in enzootic bovine haematuria (EBH) affected cows. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 59, p. 79-84, 2012.

PIAS, A. A.; VARGAS, V. R. A. Avaliação dos exames citológicos de Papanicolau com células epiteliais atípicas e respectivos exames colposcópicos com relação aos exames histológicos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 41, n. 2, p. 155-60, 2009.

PURSLEY, J. R.; WILBANK, M. C.; STEVENSON, J. S.; OTTOBRE, J. .; GARVERICK, H. A.; ANDERSON, L. L. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at synchronization of ovulation. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 295-300, 1997.

RAMPIAS, T.; SASAKI, C.; PSYRRI, A. Molecular mechanisms of hpv induced carcinogenesis in head and neck. **Oral Oncology**, v. 50, p. 356-363, 2013.

RANG, H. P.; DALLE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia aplicada**. 4th ed. In _____. Hormônios gonadotrópicos. São Paulo: Guanabara Koogan, 2001. p. 703.

RASBY, R.; DAY, M.; JOHNSON, S.; KINDER, J.; LYNCH, J.; SHORT, R.; WETTEMAM, R. P.; HAFS, H. D. Lutel function and estrus in peripubertal beef heifers treated with an intravaginal progesterone releasing device with or without a subsequent injection os estradiol. **Theriogenology**, v. 50, p. 55-63, 1998.

RECTOR, A.; MOSTMANS, S.; DOORSLAER, K. V.; McKNIGHT, C. A.; MAES, R. K.; WISE, A. G.; KIUPEL, M.; RANST, M. V. Genetic characterization of the first chiroptera papillomavirus, isolates from a basosquamous carcinoma in an Egyptian fruit

bat: The *Rousettus aegyptiacus* papillomavirus type 1. **Veterinary Microbiology**, v. 117, n. 2-4, p. 267-275, 2006.

RINTALA, M. A. M.; GREÉNMAN, S. E.; POLLANEN, P.P.; SUOMINEN, J. J. O.; SYRJANEN S. M. Detection of high- risk HPV DNA in semen and its association with the quality of semen. **Internacional Journal of STD & AIDS**, v. 15, p. 740-743, 2004.

RODRIGUES, A. D. P.; PERES, R. F. G.; LEMES, A. P.; MARTINS, T.; PEREIRA, M. H. C.; CARVALHO, E. R.; DAY, M. L. VASCONCELOS, J. L. M. Effect of interval from induction of puberty to initiation of a timed AI protocolo n pregnancy rates in Nellore heifers. **Theriogenology**, v. 82, p. 760-766, 2014.

ROPERTO, S.; BRUN, R.; PAOLINI, F. C.; URRARO, C.; RUSSO, V.; BORZACCHIELLO, G.; PAGNINI, U.; RASO, C.; RIZZO, C.; ROPERTO, F.; VENUTI, A. Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: possible biological role. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 3027-3033, 2008.

ROSSI, P.; BORGHI, G.; FERRO, R.; MENCARELLI, R. A população de 1136 GPV DNA- HR melheres positivas: expressão de p16 (INK4a)/ Ki67 Dual-Stain Cytology e diagnóstico citológico. Correlações histológicas e seguimento citológico. **Pathologica**, v. 107, n. 4, p. 185-191, 2015.

SALISTRE, M. V. **IATF: a ferramenta ideal para o melhoramento genético do seu rebanho.** Disponível em: .<[www.angus.____Org. br/ download/ download/?ID_DOWNLOAD=114](http://www.angus.____Org.br/download/download/?ID_DOWNLOAD=114)>. Acesso em: 26 abr. 2017.

SAN CLEMENTE, G.; GILL, D. K. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 16, p. 231-240, 2002.

SANTOS, J. A. **Patologia especial dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas – OEA, 1975.

SANTOS, R. M.; VASCONCELOS, J. L. M. Ingestão de concentrado e concentração plasmática de progesterona em vacas da raça Holandesa. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veteriária e Zootecnia**, v. 58, p. 1162-1167, 2006.

SCHMITT, F. C.; SOARES, R.; CIRNES, L.; SERUCA, R. P53 in breast carcinomas: association between presence of mutation and immunohistochemical expression using a semiquantitative approach. **Pathology Research and Practice**, v. 194, p. 815-819, 1998.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of Cell Physiology**, v. 182, p. 311-322, 2000.

SILVA, M. A. R. **Avaliação da presença de Papilomavírus bovino em sêmen de touros (*Bos taurus*)**. 2008. 46 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Genética, Universidade Federal do Pernambuco. Recife –PE, 2008.

TAN, M. J.; WHITE, E. A.; SOWA, M. E.; HARPER, J. W.; ASTER, J. C.; HOWLEY, P. M. Cutaneous β -human papillomavirus E proteins bind Mastermind-like coactivators and repress Notch signaling, v. 109, n. 23, p. 1473-1480, 2012.

THOMISSON, J.; THOMAS, L. K.; SHROYER, K. R. Human papillomavirus: molecular and cytologic/histologic aspects related to cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. **Human Pathology Journal**, v. 39, p. 154-166, 2008.

WOLFENSON, D.; THATCHER, W. W.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; LUCY, M. C. The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating cyclic dairy cows. **Theriogenology**, v. 42, n. 4, p. 633-644, 1994.

WOZNIACKI, S. R.; BARREIRO, M. A. B. B.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Semi-nested PCR for detection and typing of bovine *Papillomavirus* type 2 in urinary bladder

and whole blood from cattle with enzootic haematuria. **Journal of Virological Methods**, v. 126, p. 215-219, 2005.

XAVIER, E. B. S. **Estudo comparativo das diferentes classificações histológicas do grau de diferenciação no adenocarcinoma de endométrio**. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. Belo Horizonte –Minas Gerais, 2010.

ZUMBACH, K.; HOFFMANN, M.; KAHN, T.; BOSCH, F.; GOTTSCHLICH, S.; GOROGH, T.; RUDERT, H.; PAWLITA, M. Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus type 16 and 18 in patients with head-and-neck squamous- cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 85, p. 815-818, 2000.

ANEXO I

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 145/15** sobre o Projeto: "**Estudo citológico anatomopatológico, microscopia eletrônica de transmissão e molecular do papiloma virus bovino no trato reprodutivo de vacas.**", sob a responsabilidade de **Claudia Del Fava**, está de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA).

Protocolo aprovado pela CETEA-IB em 29 de outubro de 2015.

São Paulo, 29 de outubro de 2015


Ricardo Spacagna Jordão
Coordenador da CETEA-IB

CETEA - IB**Registro**

Número : 145/15

Livro : 02

Folha : 45

Data: 29/10/15

ANEXO II

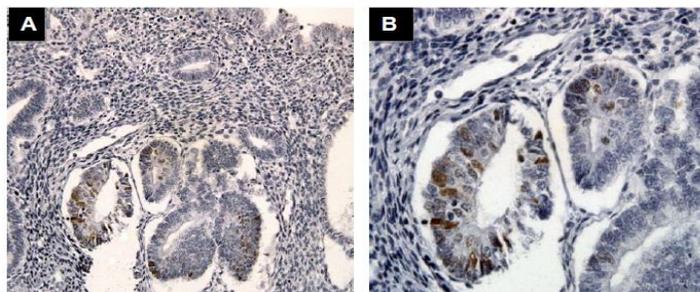


Figura 21 - Fotografia de adenocarcinoma endometrial. A expressão da proteína Ki-67 está presente em 10% dos núcleos em IHQ (XAVIER, 2010).

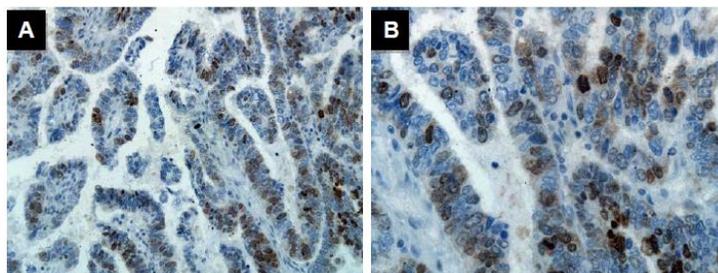


Figura 22 - Fotografia de adenocarcinoma endometria. A expressão da proteína Ki-67 está presente 50% dos núcleos em IHQ (XAVIER, 2010).

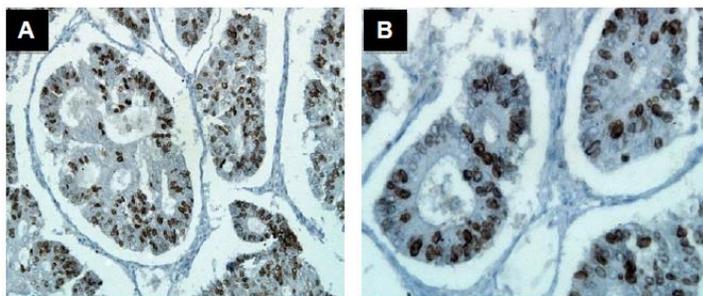


Figura 23 - Fotografia de adenocarcinoma endometrial. A expressão da proteína Ki-67 está presente 75% dos núcleos em IHQ (XAVIER, 2010).

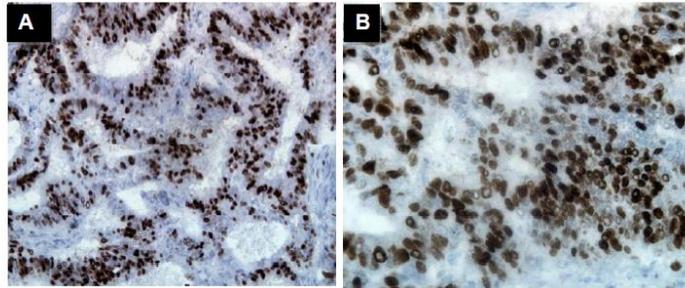
ANEXO III

Figura 24 - Fotografia de adenocarcinoma endometrial. A expressão da proteína Ki-67 está presente 90% dos núcleos em IHQ (XAVIER, 2010).