

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ANA PAULA FERREIRA CAMPOS

**CONSTRUÇÃO DE VACINAS DE DNA BASEADAS NOS GENES *E5* E *L2* DO
PAPILOMAVÍRUS BOVINO (BPV)**

RECIFE, PE

2017

ANA PAULA FERREIRA CAMPOS

**CONSTRUÇÃO DE VACINAS DE DNA BASEADAS NOS GENES *E5* E *L2* DO
PAPILOMAVÍRUS BOVINO (BPV)**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em genética da universidade federal de pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de mestre em genética.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

RECIFE, PE

2017

ANA PAULA FERREIRA CAMPOS

**CONSTRUÇÃO DE VACINAS DE DNA BASEADAS NOS GENES *E5* E *L2* DO
PAPILOMAVÍRUS BOVINO (BPV)**

Aprovado em: 24/02/2017

BANCA EXAMINADORA

Dr. Antônio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Lindomar José Pena
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dra. Fernanda Cristina Bezerra Leite
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por me conceder inteligência e subsídios necessários para o meu desenvolvimento pessoal e intelectual. E pelas boas oportunidades e por me guardar e proteger em todos os momentos da minha vida. Agradeço também:

Aos meus Pais, **Amujacy** e **Joel**, pelo amor, zelo, oportunidades oferecidas nessa vida, pela educação baseada em exemplos de estudo e perseverança, vocês são meu alicerce e todos meus esforços são para orgulhar vocês.

Aos meus Avós, **Araci**, **Angelina** e **Cristiano Jeova**, por todo cuidado, amor, carinho e incentivo para concretização dos meus planos de estudos.

As minhas Irmãs, **Pollyanna** e **Joanna**, por estarem ao meu lado nos momentos difíceis e contribuírem para o meu crescimento, e pela certeza de companhia e momentos de alegrias quando estamos juntas. “Só sei amar vocês sempre, somos irmãs”. Ao meu sobrinho, **Ghabriel**, meu amor e fonte de alegria, além de futuro pesquisador da família!

A **toda minha família**, em especial aos meus tios, tias (lindas), primas (lindas) e primos! Ao Fábio e Silbene, vocês são parte da minha família!

Aos amigos e amores que Coimbra me presenteou: **Nyele**, **Dayanne**, **Katy**, **Renan**, **Angélica**, **Gleyson** e **Rodolfo** (em especial, pela paciência!!)

Agradeço a **Recife** pela oportunidade de conhecer pessoas amigas e parceiras: **Micaelly**, **Luyse**, **Julia**, **Alexandre**, **Laryssa**, **Karin** e **Lígia**!

Ao meu orientador, **Prof. Antonio Carlos de Freitas**, pelo seu acolhimento e confiança desde o primeiro contato, quando ainda estava em Mato Grosso. Pela grande oportunidade de convivência e aprendizado, não somente sobre conhecimentos científicos, mas conduta ética profissional. Serei eternamente grata!

Ao meu co-orientador Dr. **Marcelo Nazário Cordeiro**, pelos ensinamentos compartilhados e amizade!

Anna Jéssica, obrigada por todo apoio, e por ser abrigo quando tudo dá errado! Sua amizade faz toda diferença!

André (Jesus), obrigada pela **paciência** e conhecimentos compartilhados, você vai longe meu garoto!

Rita, por dividir aflições e momentos de trabalho tanto no Lavite como no Laboratório Central!

Agradeço a todos os meus amigos e colegas do Grupo de Estudos Moleculares Aplicados a Papilomaviroses- GEMAP!

A todos os colegas **do Laboratório Central.**

Ao **LAVITE-FIOCRUZ**, em especial ao Professor Rafael Dhália pelo apoio fundamental para a realização de determinadas etapas deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

RESUMO

Os papilomavírus incluem vírus de DNA circular, geralmente envolvidos em lesões benignas do epitélio e mucosas. No entanto, alguns papilomavírus apresentam potencial oncogênico levando ao desenvolvimento de doenças como a papilomatose bovina. Atualmente, é sabido que a proteína L2 que compõe a estrutura do capsídeo, e alguns de seus epítomos são capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes. Além disso, a oncoproteína E5 é responsável pelo crescimento e transformação celular, sendo o principal gene de transformação em bovinos. Entretanto, não existe disponível vacina comercial eficaz contra a infecção pelo BPV. Dessa forma, o presente trabalho consiste na construção de candidatos vacinais por meio de vacina de DNA contra a infecção por BPV. Para tal, tivemos como objetivo específico a construção de vetores vacinais a partir do plasmídeo pCI-neo e avaliamos *in vitro* a expressão dos respectivos antígenos em células de mamíferos. Os genes escolhidos para o estudo, L2 selvagem e o seu epítomo contido entre os aminoácidos 11 a 200, além do oncogene E5 selvagem, foram amplificados por PCR, clonados individualmente no vetor plasmidial pGEM-T *easy* e propagados em *Escherichia coli* (linhagem DH5α). Em seguida, os genes de trabalho foram previamente digeridos e subclonados no vetor pCI-neo para expressão em células de mamífero, incluindo o gene E5 sintético códon otimizado. Ambas as sequências foram avaliadas por digestão enzimática e por sequenciamento. A avaliação da funcionalidade das construções foi realizada pela expressão das mesmas em cultura de células embrionárias do Rim Humano (HEK-293 - *Human embryonic kidney cell*) seguida por análise da expressão gênica via RT-PCR e dos extratos proteicos por SDS-PAGE e *Western-Blot*. Os resultados obtidos apresentaram a expressão dos genes L2^{wt}, L2¹¹⁻²⁰⁰ e E5^{otimizado} confirmada por RT-PCR. No entanto, a produção das respectivas proteica não foi detectada pela análise via *immunoblotting*, demonstrando que melhorias no protocolo são necessárias.

Palavras-chave: Papilomavírus bovino. Vacina de DNA. Expressão heteróloga.

ABSTRACT

Papillomaviruses are circular DNA viruses, generally involved in benign lesions of the epithelium and mucous membranes. However, some papillomaviruses present oncogenic potential leading to the development of diseases such as bovine papillomatosis. Currently, it is known that the viral capsid L2 protein and some of its epitopes are capable of inducing the production of neutralizing antibodies. In addition, the E5 oncoprotein is responsible for cell growth and transformation, being the main transformation gene in cattle. However, no effective commercial vaccine against BPV infection is available. Thus, the present work consists of the construction of vaccine candidates by means of DNA vaccine against BPV infection. For this purpose, we specifically aimed to construct vaccine vectors from the plasmid pCI-neo and evaluated the expression of the respective antigens *in vitro* in mammalian cells. The genes chosen for the study, the entire L2 sequence and its epitope contained between the amino acids 11 to 200 and the wild-type E5 oncogene, were amplified by PCR, individually cloned into the pGEM-T easy vector and propagated in *Escherichia coli* (strain DH5 α). Then, the working genes were pre-digested and subcloned into the pCI-neo vector for expression in mammalian cells, including the synthetic codon optimized E5 gene. Both sequences were evaluated by enzymatic digestion and sequencing. The evaluation of the functionality of the constructs was performed by gene expression in Human Kidney embryo cell (HEK-293) followed by analysis of the gene transcription via RT-PCR and of protein extract via SDS-PAGE and Western Blot. The results obtained showed the expression of the genes L2^{wt}, L2¹¹⁻²⁰⁰ and E5^{optimized} confirmed by RT-PCR. However, production of the respective proteins was not detected by immunoblotting analysis, demonstrating that improvements in the protocol are required.

Keywords: Bovine Papillomavirus. DNA Vaccine. Heterologous Expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Panorama do consumo, exportação e produção da carne bovina	17
Figura 2: Representação do Capsídeo e Capsômero	18
Figura 3: Representação linear genérica do genoma do Papilomavírus	19
Figura 4: Ciclo de infecção do Papilomavírus - PV	21
Figura 5: Ciclo produtivo viral	23
Figura 6. Diferença entre papiloma e fibropapiloma	25
Figura 7: Tumor de bexiga urinária de bovinos	26
Figura 8: Esquema representando a carcinogênese em bexiga urinária em bovinos.....	27
Figura 9: Esquema representando o dímero de E5 de BPV 1	35
Figura 10: Interação da proteína E5 com o Receptor – PDGF β	36
Figura 11: Capsídeo viral	38
Figura 12: Diagrama apresentando os epítomos neutralizadores de L2	39
Figura 13: Regiões de alta conservação de L2	40
Figura 14: Esquema da construção dos genes	44
Figura 15: Mapa do vetor circular pGEM-T Easy (Promega®).....	45
Figura 16: Mapa do Vetor de Expressão em Mamíferos pCI-neo (Promega®).....	47
Figura 17: Digestão das construções pCIE5wt e pCIE5 sintético códon otimizado	55
Figura 18: Digestão das construções pCIL2wt e pCIL2 (11-200)	56
Figura 19: RT-PCR para análise da transcrição dos genes L2wt e L2 11-200	57
Figura 20: RT-PCR para análise da transcrição dos genes E5wt e E5oti	58
Figura 21: PCR das amostras evidenciando não contaminação com DNA	59
Figura 22: SDS – PAGE	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de amostras infectadas com 1 ou mais tipos de BPVs	28
Tabela 2: Reação para a transcrição reversa.....	51
Tabela 3: Quantificação por Bradford.	61

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Aminoácido
ATP	Adenosina trifosfato
Asp 33	Asparagina 33
BPV	Papilomavirus bovino
CRT	Calreticulin
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido Tetracético Etilenodiamina
FAO	Food and Agricultural Organiation
Gln 17	Glutamina 17
HEK 293	Human embrionic kidney cell
HPV	Papilomavírus humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Meio Luria Bertani
LCR	Long Control Region
L2x	Laemmli 2x
MHC I	Complexo de histocompatibilidade principal classe I
ORF	Open Reading Frames
Pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF β	Platelet-derived growth factor β receptor
pRb	Proteína retinoblastoma
PV	Papilomavirus
p300	Proteína co-ativadora transcricional
p600	Proteína de membrana ligada a morfogêneses
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Docecil Sulfato de Sódio
TAE	Tris- Acetato-EDTA
USDA	United States Department of Agriculture

VLP

Virus like particle

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 ASPECTOS GERAIS E ECONÔMICOS DA DOENÇA	15
2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO PAPILOMAVÍRUS.....	18
2.3 CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO	19
2.4 CICLO VIRAL DOS PAPILOMAVÍRUS	19
2.5 PAPILOMAVÍRUS BOVINO (BPV).....	23
2.6 RESPOSTA IMUNE CONTRA O PAPILOMAVÍRUS	28
2.6.1 Imunidade inata	29
2.6.2 Imunidade Adaptativa.....	30
2.7 VACINAS DE DNA	31
2.8 A PROTEÍNA E5 COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA VACINAL	34
2.9 ATIVIDADE TRANSFORMADORA DE E5.....	35
2.10 A PROTEÍNA L2 COMO ESTRATÉGIA PROFILÁTICA VACINAL	37
3 OBJETIVOS	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 AMPLIFICAÇÃO E DESENHO DOS GENES L2 E E5.....	43
4.2 CLONAGEM PGEM-T-EASY	44
4.3 TRANSFORMAÇÃO	45
4.4 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	46
4.5 LISE CELULAR	46
4.6 DIGESTÃO E LIGAÇÃO NO VETOR DE EXPRESSÃO PCI-NEO.....	47
4.7 ELETROFORESE DE DNA.....	48

4.8 SEQUENCIAMENTO DAS CONSTRUÇÕES	48
4.9 CULTIVO, TRANSFEÇÃO E LISE DAS CÉLULAS HEK – 293.....	48
4.10 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS.....	49
4.11 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE E5 E L2.....	50
4.11.1 Extração do RNA total das células Hek 293	50
4.11.2 Síntese de cDNA e RT-PCR.....	50
4.11.3 Eletroforese e Imunodeteção de Proteínas.....	51
5 RESULTADOS	52
5.1 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES E5 E L2	52
5.2 CLONAGEM DOS GENE E5 E L2	53
5.3 ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES L2 E E5.....	56
5.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E QUANTIFICAÇÃO POR BRADFORD	59
5.5 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS L2 E E5.....	61
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura e os seus derivados são um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário local e mundial. O Brasil desde o ano de 2004 está entre os líderes na exportação de carne bovina com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países. O Brasil possui o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças e está em 6º lugar do *ranking* dos países produtores de leite. As atividades relacionadas aos dois segmentos principais, carne e leite, representam lucro aproximado de R\$ 67 bilhões. Além disso, é uma atividade presente em quase todo território brasileiro, o que demonstra a importância econômica e social da bovinocultura para nosso país.

Entretanto, algumas doenças possuem potencial para causar prejuízos consideráveis para o setor, principalmente naqueles animais de importância econômica, como o gado. A papilomatose bovina é uma doença infectocontagiosa causada pelos papilomavírus bovino - BPV. Os BPVs apresentam natureza mucoepitelial, e caracterizam-se por exibirem tumores epiteliais e fibropapilomas, além de estarem dispersos por todo território mundial.

Contudo, a doença ainda não possui notificação compulsória, e é muitas vezes ignorada pelos criadores. Ademais, as recentes descobertas da sua relação com determinados tipos de câncer em espécies de répteis, aves e mamíferos apontam uma maior preocupação com medidas de contenção e prevenção da mesma. Atualmente, 13 tipos de BPVs estão descritos, sendo classificados de acordo com critérios histopatológicos, imunológicos e moleculares. O BPV 2 está relacionado com o câncer de bexiga urinária, fibropapilomas e papilomas epiteliais, além de ser um dos tipos mais frequentes em território nacional.

Apesar da importância da doença, ainda não existe uma medida efetiva de sua prevenção e controle. Por isso, um dos métodos mais utilizados pelos criadores para seu controle é a auto-vacinação, baseada em extrato bruto de verrugas retiradas do próprio animal.

Porém, este método não apresenta muito sucesso, e expõem o animal a outros tipos de infecções. Portanto, se faz necessário e é muito aguardada uma estratégia vacinal para esta doença, uma vez que não existem vacinas comerciais disponíveis.

Diversos estudos observaram a eficácia de vacinas contra a infecção pelos PV utilizando-se os genes precoces da infecção como a oncoproteína E5. A oncoproteína E5 é conhecida por desempenhar atividade de transformação celular, ao ligar-se e ativar o receptor PDGF β - PDGF β -R - *Platelet-derived growth factor β receptor*. As características de E5 incentivaram um recente crescimento de estudos para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas baseadas no gene E5 de HPV. No entanto, existem poucos trabalhos explorando o papel de E5 como estratégia vacinal terapêutica contra a infecção pelo BPV.

Outros estudos baseiam-se no gene L2 de expressão tardia e que compõem o capsídeo viral, ou no seu produto gênico. Além disso, é sabido que alguns epítomos da proteína L2 são responsáveis por elicitar uma resposta cruzada entre os diversos tipos de PVs, o que torna o estudo com BPV um modelo experimental viável, de baixo custo e de interesse econômico para o desenvolvimento de estratégias contra a infecção pelos HPVs.

Dessa maneira, o presente trabalho visa o desenvolvimento de construções vacinais contendo o gene E5 e L2 do papilomavírus bovino tipo 2. Além disso, espera-se confirmar a atividade dessas construções por expressão em sistema de expressão eucarioto, especificamente em células de mamíferos HEK-293.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS E ECONÔMICOS DA DOENÇA

Segundo a *United States Department of Agriculture* - USDA (2014) e a *Foreign Agricultural Service* - FAO (2015), o Brasil é o maior exportador de carne do mundo, sendo esta uma das principais *commodities* agrícolas de exportação brasileira. Entretanto, a maior parte de seu consumo, ainda é destinada ao mercado interno. Além disso, o Brasil possui o

maior rebanho comercial do mundo, ocupando o 6º lugar entre os países que mais produzem leite e o 2º lugar do *ranking* entre os maiores produtores de carne mundial. Ainda segundo dados da FAO (2015) há previsão do aumento do rebanho brasileiro pela forte demanda internacional, e uma estimativa de crescimento médio de 2,7% ao ano nas exportações de carne bovina, o que pode elevar o chamado Mt (equivalente a peso da carcaça) chegando a 2,6 Mt em 2024. Estima-se que também haverá um aumento de 1,1% na taxa média da produção de carne para o ano 2024. O conjunto de dados apresentados aponta para o grande papel econômico do gado na agropecuária brasileira (Figura 1) e consequentemente a relevância de pesquisas que venham a colaborar com o desenvolvimento do setor.

Segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne (ABIEC, 2016), no ano de 2015 as exportações de carne bovina geraram receita de US\$5,9 bilhões, representado assim, 3% de tudo o que o Brasil exportou em 2015, tendo como principais destinos internacionais Hong Kong (18%) e União Europeia (14%). A cadeia produtiva da pecuária no Brasil movimentou valores acima de R\$483,5 bilhões no mesmo ano, além de possuir 209,13 milhões de cabeças de gado que se concentram principalmente nas regiões Centro-oeste, Sul e Sudeste. Igualmente, o setor possui importância em setores que empregam (fazendas e indústrias) tendo os valores de salários e encargos dos funcionários somados mais de R\$11,37 bilhões.

Outro importante setor econômico mundial está ligado à cadeia produtiva do couro e tem seu início na pecuária, e apresentando entre os anos 2012 e 2013 crescimento de 20% nas exportações brasileiras, gerando um lucro acima dos US\$ 2 bilhões. Dentre todos os estados brasileiros, Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás lideram as exportações do couro no Brasil, que têm como principais destinos à China, a Itália e os Estados Unidos (Brasil, 2015).

A papilomatose bovina é uma doença infectocontagiosa que pode comprometer severamente a lucratividade do rebanho, cujos sinais clínicos decorrem da infecção pelo

papilomavírus bovino (BPV). A infecção quando sintomática é caracterizada por lesões hiperproliferativas conhecidas vulgarmente como verrugas de pele (Antonsson e McMillan, 2006). A doença é causada por um grupo de vírus que pertence a Família *Papillomaviridae*, a qual possui grande diversidade genética e além de infectar mamíferos, aves e répteis (Bernard, 2005).

Em bovinos, os danos causados por lesões ao couro do animal pode levar a perda do valor econômico do rebanho, assim como, o aumento da susceptibilidade a infecções secundárias, a perda de peso e a redução da produção de carne e do leite. Em grande parte dos casos na tentativa de limitar maiores gastos com o animal, bem como a disseminação da doença, adota-se o sacrifício (USDA, 2014).

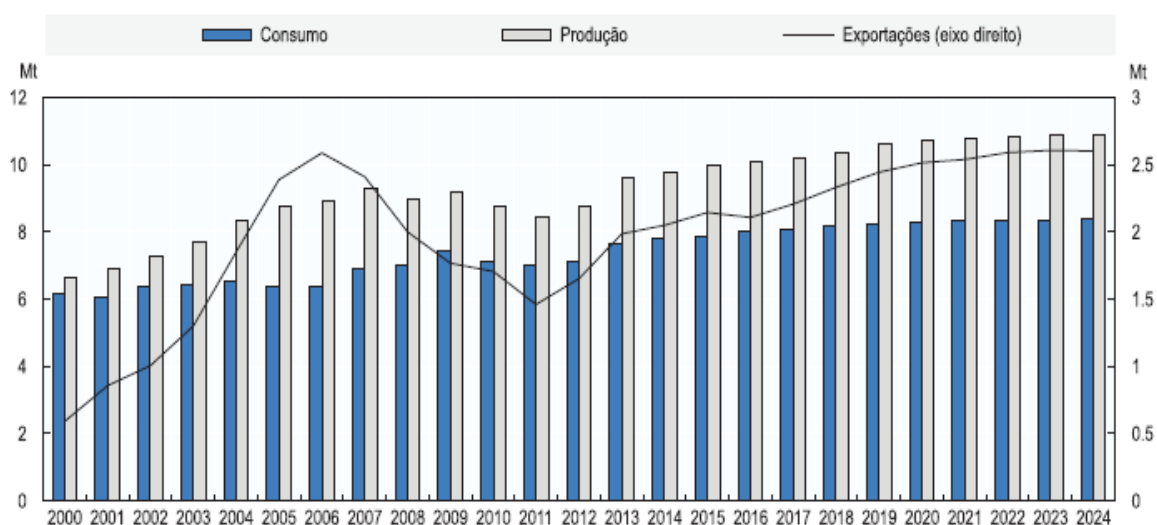


Figura 1: Panorama do consumo, exportação e produção da carne bovina. Os dados apontam a estimativa para o Brasil do consumo, exportação e produção de carne até o ano de 2024. Mt -peso da carcaça em milhões de toneladas (adaptado de OECD/FAO, 2015).

É sabido também que não há disponível vacina comercial eficaz contra a infecção pelos tipos de BPVs, além de não haver terapia eficiente e reprodutível para animais já infectados. Alguns estudos apontam para o uso da auto-vacina, que se baseia na administração de uma suspensão de tecidos em formol obtida a partir de verrugas dos próprios animais

infectados como um possível método de tratamento e indução de resposta humoral. Porém, essa estratégia vacinal não leva a proteção contra todos os tipos virais existentes, e ainda não há um consenso sobre os reais efeitos da proteção promovida pela auto-vacina (Turk *et al*, 2005).

2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO PAPILLOMAVÍRUS

Os papilomavírus são vírus pequenos, que possuem uma estrutura icosaédrica, não envelopados e medem cerca de 55nm. Seu capsídeo apresenta 72 capsômeros, formados por pentâmeros da proteína principal L1 e também da proteína menor L2, que possui o terminal-N voltado para a camada externa ao capsídeo enquanto o terminal-C encontra-se ligado ao genoma viral. O DNA de dupla-fita circular do vírus encerra seu genoma, de aproximadamente 8 Kb (Garcea e Chen, 2007. Campo e Roden, 2010) (Figura 2).

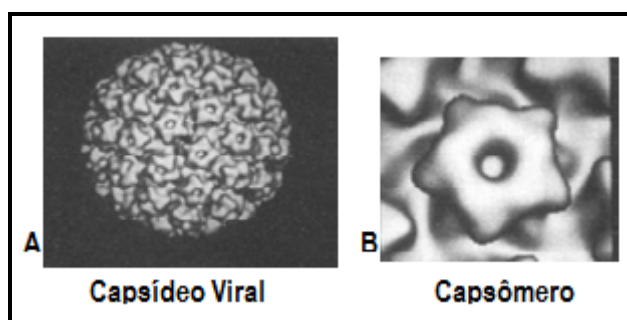


Figura 2: Representação do Capsídeo e Capsômero. **A.** Superfície de um capsídeo viral de HPV- 1. **B** Representação do pentâmero (capsômero) que compõem o capsídeo viral - proteínas estruturais L1 e L2 (adaptado de Hangensee *et al*, 1994).

No genoma do papilomavírus estão presentes dois segmentos principais, as ORFs (*Open Reading Frames*) e a LCR (*Long Control Region*). As ORFs contêm sequências que codificam as proteínas virais, as quais podem ser não estruturais, codificadas pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, ou estruturais, codificadas pelos genes L1 e L2. Os genes “E” (*early* – precoce) obedecem a um padrão de expressão mais imediato após a entrada no genoma viral no núcleo celular, enquanto os genes “L” (*late* – tardio) são expressos nas fases finais do ciclo

viral. Na LCR estão contidos elementos regulatórios da transcrição e replicação viral, sendo sítio de aporte de fatores virais e do hospedeiro, como apresentado na Figura 3 (Southern e Henrrington, 1998. Campo e Roden, 2010).

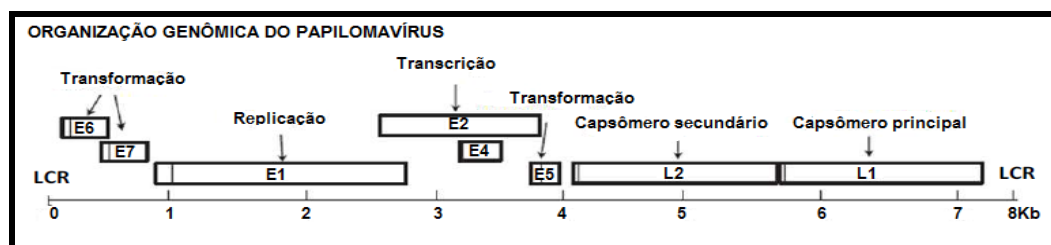


Figura 3: Representação linear genérica do genoma do Papilomavírus. Os retângulos representam as ORFs e os papéis gênicos estão identificados acima. Os traços na vertical marcam o códon de iniciação. E a região de controle regulatório – LCR (adaptado de Nasir e Campo, 2008).

2.3 CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO

Os Papilomavírus são membros da Família *Papillomaviridae* que até o presente momento apresenta 33 gêneros conhecidos e 280 tipos de PVs. Possui cerca de 170 tipos de Papilomavírus Humano – HPV já descritos que estão classificados dentro de 5 gêneros. Os BPVs estão agrupados em 4 gêneros e até o presente momento somente 13 tipos são conhecidos. O menor número de tipos virais identificadas dentre os BPVs comparado aos de HPV se deve, em parte, ao fato de existirem mais pesquisas com as formas de PVs que infectam humanos do que com as formas que infectam os animais (Munday, 2014).

Os BPVs tipos 1, 2 e 13 estão agrupados dentro do gênero Delta-Papilomavírus e os tipos 5 e 8 no gênero Epsilon-Papilomavírus. O gênero Xi-papilomavírus possui o maior número de BPVs já identificados, são os tipos 3, 4, 6, 9, 10, 11 e 12. Enquanto o gênero mais recente identificado possui apenas o tipo 7 como seu representante (Rector e Ranst, 2013).

2.4 CICLO VIRAL DOS PAPILOMAVÍRUS

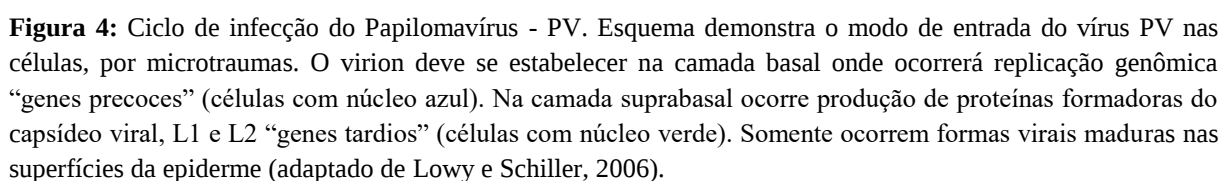
O ciclo viral dos papilomavírus relaciona-se fortemente com a diferenciação epitelial, uma vez que se replica no epitélio escamoso estratificado da pele e de mucosas, o que

caracteriza o tropismo celular desses vírus. O início do processo infeccioso ocorre na camada basal do epitélio, por meio de microlesões ou abrasões superficiais e que adentram até a camada basal. No entanto, para que ocorra a liberação de seus vírions não envelopados há necessidade da ruptura celular normal, sendo mais comumente observada próxima à superfície do epitélio. Após a infecção viral, são necessárias algumas semanas para liberação dos virions para que o queratinócito basal, após infectado, submeta-se a diferenciação e descamação (Stanley, 2005; Buck *et al.*, 2005).

A expressão dos genes virais precoces da infecção inicia-se na camada basal enquanto os genes estruturais são expressos nas camadas celulares apicais da epiderme infectada. Os papilomavírus codificam duas proteínas estruturais formadoras do capsídeo viral, L1 e L2, referidos como genes tardios da infecção, que compõem o capsídeo e permitem a inserção do genoma viral recém-sintetizado. À medida que as partículas virais amadurecem, ocorre a divisão celular que coloca as células filhas hospedeira mais próxima a camada apical do epitélio. Queratinócitos em estágio final de diferenciação liberam partículas virais durante a descamação da região queratinizada do epitélio (Figura 4) (Campo, 1997; Doorbar, 2005).

Quanto ao aparecimento das lesões provocadas pelo vírus, o tempo pode variar entre semanas e meses, evidenciando que o vírus pode evadir o sistema imune e também se manter em estado de latência nas camadas basais, por longos períodos. Isso é possível, pois algumas proteínas são responsáveis por atrasar a condensação nuclear, e então, permitirem a replicação viral. Entretanto, não acompanha sinais de inflamação, o que pode levar a uma infecção persistente, sem que o sistema imune do hospedeiro detecte a presença viral (Stanley, 2005).

Todas essas características dos papilomavírus dificultam a tarefa de mimetizar a diferenciação do epitélio estratificado em culturas de células e tem sido um desafio para o estudo do ciclo de vida desses vírus, o que também é um fator limitante à montagem de um



No início da infecção, abrasões nas camadas celulares possibilitaram a entrada dos vírions, que depois de introduzidos, nas células basais do epitélio perdem o capsídeo e se mantêm em baixo número de cópias genômicas episomais. As proteínas virais do PV, E1 e E2 estão relacionadas com a manutenção do DNA viral em sua forma episomal e garantem uma segregação correta do genoma durante a divisão celular (Doorbar, 2005).

A proteína E2 atua como fator de transcrição, onde desempenha um papel de estimular a ligação da proteína E1 à origem de replicação, especificamente, na região LCR, com isso, possibilitando que E1 desempenhe sua atividade helicase dependente de ATP, a qual leva a replicação do DNA viral (Yang *et al*, 1991). Nos HPVs a proteína E2 atua também como repressora das atividades dos oncogenes E6 e E7, como visto no trabalho de Schwarz *et al*. (1985). Ambos os genes E6 e E7 são relacionados com funções que interferem na regulação

do ciclo celular. E7 ao se ligar com pRb, uma reguladora negativa do ciclo celular, dispara a atividade da proteína E2, que sinaliza para transcrição e produção de outras novas proteínas necessárias à replicação do DNA viral (Doorbar, 2005).

Diferentemente, as oncoproteínas E6 e E7 possuem importância relativa diferenciada na transformação celular, variando de acordo com os tipos virais de BPVs. Os Deltapapilomavírus expressam os genes E5, E6 e E7, e os Xi papilomavírus não expressam o gene E6 (Campo, 2006). A oncoproteína E6 de BPV interage e inibe a transcrição do co-ativador p300, e inibe o papel do supressor p53, assim como nos HPVs (Zimmerman *et al.*, 2000). Estudos recentes revelaram que a oncoproteína E7 dos Delta-papilomavírus pode ligar-se ao alvo celular p600 e induzir transformação celular (Nasir e Campo, 2008).

A etapa do empacotamento do genoma viral só se inicia quando há produção das proteínas L1 e L2 (figura 5). Para que isso ocorra, E2 recruta a proteína L2 para regiões de replicação antes mesmo da expressão da proteína L1 e montagem do capsídeo icosaedro. A principal proteína formadora do capsídeo L1 é composta por 72 pentâmeros, já a proteína L2 possui 12 cópias. L2 consegue cruzar o capsídeo e ligar-se ao genoma viral, além do seu papel importante na infecção, o de se ligar-se a receptores e facilitar a condução dos vírions para o núcleo celular. (Pereira *et al*, 2009; Buck, 2005). A expressão das proteínas estruturais só está presente nas camadas superiores do epitélio escamoso, não sendo detectada nas camadas basais infectadas por PV, compatível com o empacotamento do genoma viral que ocorre nessa etapa (Wang e Roden, 2013). Para que ocorra a propagação viral, o vírus precisa escapar do sistema imune, e também sobreviver em meio extracelular após ser liberado da célula infectada. Além disso, após a sua maturação nas superfícies do epitélio os vírions são liberados juntos por descamação natural (Doorbar, 2005).

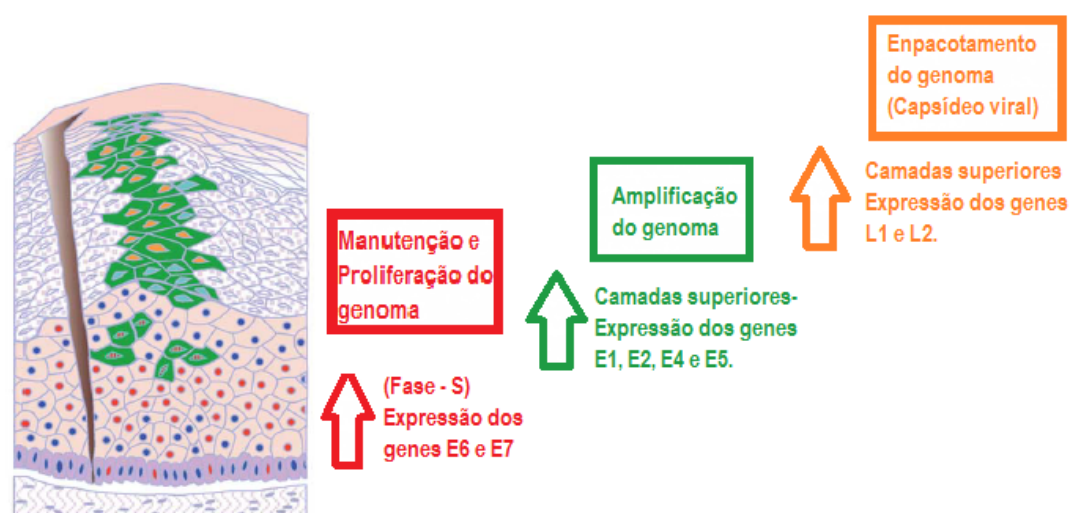


Figura 5: Ciclo produtivo viral. Representação esquemática da pele demonstra padrão da expressão dos genes “E” (*early* – precoce) e “L” (*late* – tardio) e revelação da migração das células infectadas para a superfície do epitélio (Adaptado de Doorbar, 2005).

2.5 PAPILOMAVÍRUS BOVINO (BPV)

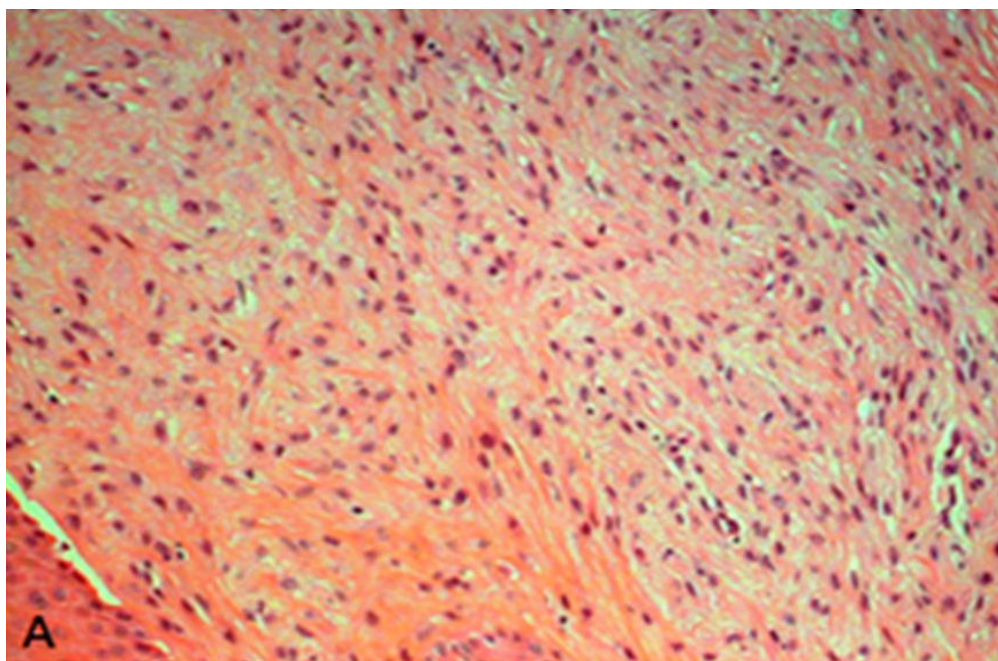
A papilomatose bovina (PB) é a doença originada pela infecção com os variados de tipos de papilomavírus bovino, que comumente atinge animais com idade inferior a dois anos. As lesões geradas por essa infecção podem levar ao desenvolvimento de tumores de natureza benigna, podendo algumas vezes progredir para as formas mais graves (Monteiro *et al*, 2008). Os papilomavírus são caracterizados por se apresentarem de forma espécie-específica e com tropismo celular. A maioria dos BPVs possui tropismo por células epiteliais, fibroepiteliais ou por tecidos de revestimento das cavidades internas do corpo, como a mucosa (Munday, 2014), embora a presença viral já tenha sido detectada até mesmo no sangue de animais infectados (Santos *et al*, 2013).

Os papilomavírus são encontrados ao redor do mundo inteiro e a transmissão do vírus pode ocorrer via contato direto ou indireto entre animais que estejam infectados, no contato direto com lesões expostas e contaminadas, ocorrendo muitas vezes na ordenha desses

animais, bebedouros, comedouros, objetos de uso comum ou até mesmo por insetos (Araldi *et al*, 2015).

Além disso, infecções com BPV não possuem associação com gênero, sendo detectados tanto em machos como em fêmeas, nem apresentam associação com idade específica entre os animais. Recentes estudos, como o de Batista (2013) e Claus *et al* (2008) demonstraram que não há um padrão geográfico de distribuição entre os tipos virais conhecidos, indicando que os BPVs podem estar dispersos de forma igualitária entre o território brasileiro.

A maioria dos BPVs são epiteliotróficos, contudo, os tipos virais pertencentes ao gênero Delta-papilomavirus, mesmo caracterizados por sua preferencia em infectar os fibroblastos, também apresentam potencial de infecção de células do epitélio superficial, mesenquimais e sanguíneas. E que podem ocasionar tumores benignos ou malignos da pele e/ou mucosa (Santos *et al.*, 2013. Roperto *et al*, 2015. Munday, 2014).



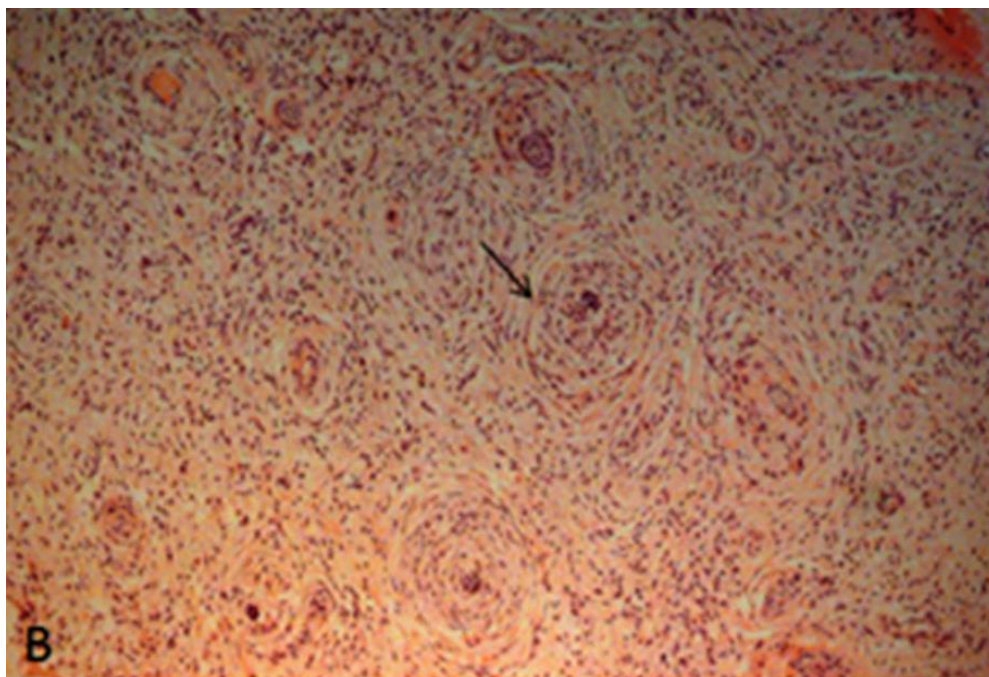


Figura 6. Diferença entre papiloma e fibropapiloma. **A.** Estroma de papiloma infectado com BPV 3. **B.** Estroma de fibropapiloma infectado com BPV 2. Seta apontando para a organização fascicular dos fibroblastos (Adaptado de Araldi *et al*, 2015).

Os papilomas mucocutâneos, ou mais vulgarmente conhecidos como verrugas, são muito comuns em animais jovens e a maioria dos bovinos em alguma fase da vida irá desenvolvê-las. As verrugas animais possuem muita similaridade com as apresentadas em humanos. Além disso, existem estudos que confirmam os treze tipos de BPVs (exceto o BPV 4) como causa dos papilomas cutâneo e fibropapilomas. Os fibropapilomas são originados da proliferação do tecido fibroso e mesenquimais que reveste as cavidades internas da mucosa, e que são cobertos por um epitélio hiperplásico com atividade produtiva (Tessele e Barros, 2016; Munday, 2014) (Figura 6).

Dentre os 13 tipos de BPVs conhecidos, exclusivamente os tipos 1 e 2 adquiriram a aptidão de infectar tanto as células epiteliais como mesenquimais (Roperto *et al*, 2015) e os tipos BPV-1, BPV-2, BPV-13 podem infectar tanto os equídeos como os bovinos, e ocasionalmente, levar ao surgimento de tumores (Munday, 2014). Os BPVs 1 e 2 estão ambos associados as verrugas na pele e câncer de bexiga urinária, enquanto o BPV 1 é associado aos papilomas no pênis (Campo, 2002). O BPV tipo 2 está associado aos casos de câncer de

bexiga urinária ou carcinoma urotelial, além disso, a proteína E5 é a mais expressa em casos de câncer derivados da infecção cujos tipos virais estão agrupados dentro do gênero Delta-papilomavirus (Roperto *et al*, 2015). Há ainda, uma associação estabelecida entre a infecção por BPV e modificações celulares induzidas pelo pastejo de samambaia (*Pteridium aquilinum*) podendo contribuir para o desenvolvimento de câncer do trato alimentar (BPV-4) e o câncer de bexiga (BPV-2) (Borzacchiello e Roperto, 2008) (Figura 7).

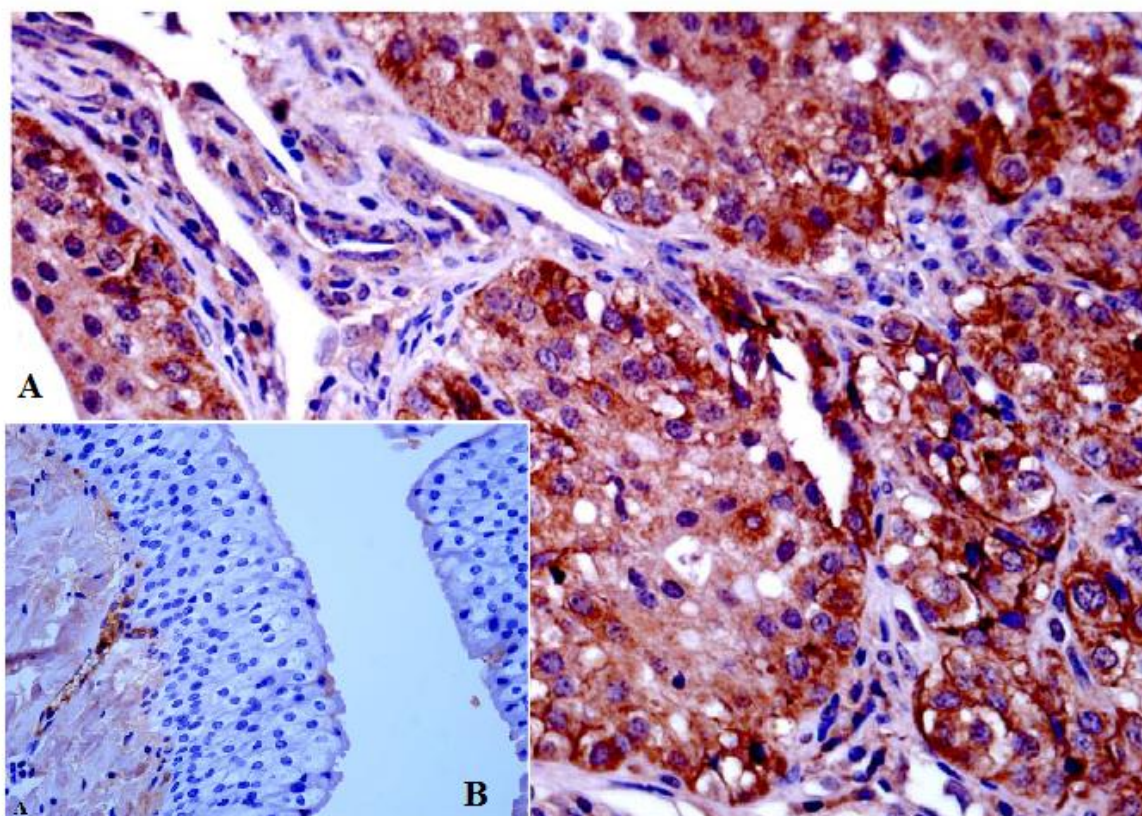


Figura 7: Tumor de bexiga urinária de bovinos. **A.** Células normais da bexiga. **B.** Células neoplásicas da bexiga – Confirmação por Imunohistoquímica da proteína L1) (Adaptado de Roperto *et al*, 2013. Borzacchiello e Roperto, 2008).

Apesar da relação infecção e a indução de lesões malignas já encontrar-se bem instituída (Araldi *et al*, 2015) os casos de tumores de bexiga em bovinos estão comumente associados com a síndrome da hematúria enzoótica (HE), que possui como fator desencadeante a ingestão prolongada de brotos de samambaia. No entanto, evidências epidemiológica sugeriram o estabelecimento da infecção viral como fator importante e

causador da progressão maligna dessas lesões, isso devido articulação entre os agentes da infecção presentes nos bovinos e os compostos mutagênicos e imunossupressores presentes nessa planta (Wosiacki *et al*, 2002) que podem então induzir a ativação da expressão dos genes virais, como E5 e E7. Há ainda, casos de câncer de bexiga e a infecção por BPV 2 coassociados ao aumento da atividade da telomerase, super expressão dos genes das isoformas da ciclooxygenase (COX-1 e 2) e do oncogêneo H-ras, bem como, a ligação da oncoproteína E5 ao receptor receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta PDGF- β (Borzacchiello e Roperto, 2008) (Figura 8).

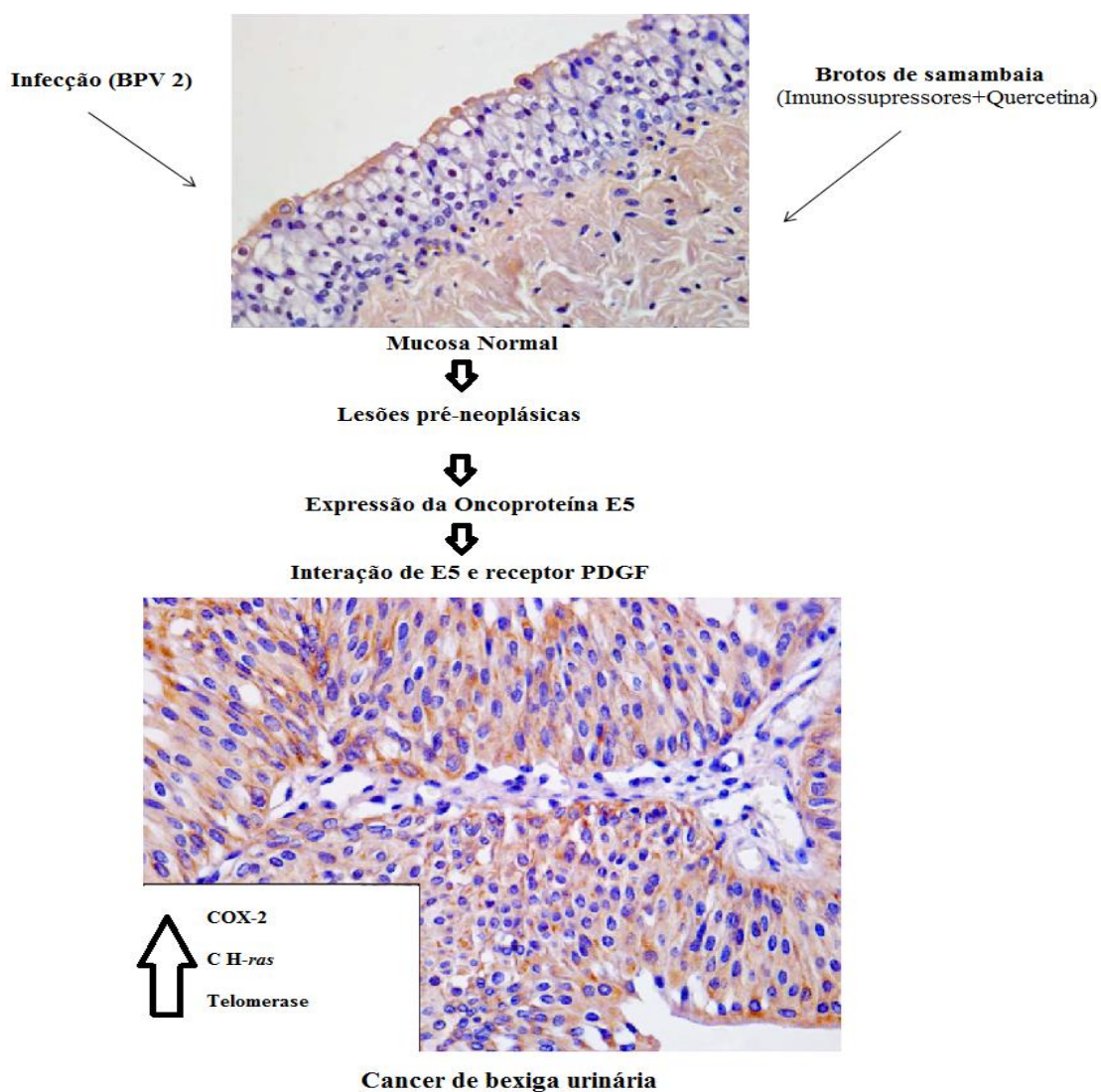


Figura 8: Esquema representando a carcinogênese em bexiga urinária em bovinos que ingerem o broto de samambaia e eventos celulares relacionados a essa interação (Borzacchiello *et al.*, 2008).

Em Carvalho *et al* (2013), amostras obtidas de 72 lesões em gados de Pernambuco e Bahia, exibiram co-infecção por diversos tipos de BPV. Uma alta ocorrência dos tipos 1 e 2 de BPV foi detectada, e além disso o BPV 3, que é uma forma rara e pouco conhecida, também foi detectada na maioria das amostras. Além desses tipos citados anteriormente, os BPVs 5 e 6, que são comumente associados a lesões nas tetas também foram apresentadas. Os BPVs 8, 9 e 10, associados a lesões cutâneas também foram encontrados. Esses dados apontam para os principais tipos de BPV incidentes na região Nordeste (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem de amostras infectadas com 1 ou mais tipos de BPVs

Tipo Viral Presente	Freq. Absoluta	Freq. Relativa
BPV tipos 1, 2, e 3	2	2.8
BPV tipos 2 e 10	3	4.2
BPV tipos 2 e 3	21	29.1
BPV tipos 2, 3 e 10	13	18.1
BPV tipos 2, 3 e 4	10	13.8
BPV tipos 2, 3, 4 e 10	4	5.6
BPV tipos 2, 3 e 5	2	2.8
BPV tipos 2, 3 e 8	1	1.4
BPV tipos 2, 3 e 9	1	1.4
BPV tipos 2, 3, 9 e 10	1	1.4
BPV tipos 2 e 4	3	4.2
BPV tipos 2, 4 e 8	1	1.4
BPV tipos 2, 6 e 10	1	1.4
BPV tipos 2, 8 e 10	1	1.4
BPV tipos 10	1	1.4
BPV tipos 2	7	9.6
Total	72	100

Fonte: Adaptado de Carvalho *et al*, 2013.

2.6 RESPOSTA IMUNE CONTRA O PAPILOMAVÍRUS

Os Papilomavírus (PVs) são conhecidos por causarem lesões no epitélio cutâneo ou da mucosa, como as vulgarmente conhecidas verrugas cutâneas. Suas lesões podem desenvolver-se em tumores, geralmente benignos, e que na maioria das vezes são solucionados de forma espontânea em um período de meses ou anos (McGarvie *et al*, 1995; Scott *et al*, 2001). No entanto, algumas lesões, como no caso das derivadas da infecção com HPV tipo 16, implicam

na formação de carcinomas celulares da cérvix (Zur Hausen, 2002). Outro exemplo é o câncer no canal alimentar dos bovinos que deriva da infecção com BPV tipo 4 (Campo, 1994).

Os PVs são agentes infecciosos considerados de sucesso, pois induzem a persistentes infecções sem que para isso tenha que comprometer severamente o hospedeiro. O hospedeiro por sua vez transmite os novos vírions a indivíduos sadios, perpetuando o ciclo viral (Mariani e Venuti, 2011). O equilíbrio entre a infecção e o escape do vírus contra o sistema imune do hospedeiro é o que permite a persistência e propagação do vírus. Isso ocorre já que, na fase precoce suas nucleoproteínas são pobremente produzidas no epitélio basal e não são secretadas e apresentadas ao sistema de defesa inato. Outro aspecto é que um importante ativador da imunidade inata e da adaptativa não é acionado, a morte celular, o que o torna um patógeno fraco quando comparado a outros, e que provoca apenas uma resposta imunológica lenta e baixa do hospedeiro (Frazer, 2007).

2.6.1 Imunidade inata

Nas fases iniciais da infecção por Papilomavírus, a primeira defesa apresentada pelo hospedeiro advinda contra os patógenos são as células dendríticas, interferons α , citocinas inflamatórias, neutrófilos e macrófagos (Mariani e Venuti, 2010). Uma família de receptores imunológicos, os denominados receptores *Toll-like* (TLRs) localizados na superfície celular dos endossomos reconhecem os patógenos e ativam vias de sinalização de respostas inata e adaptativa (Bon, 2002). Alguns desses componentes da defesa inata, como por exemplo, os *Interferons* (IFN) são relatados como responsáveis pela regressão das lesões causadas pelos PVs. No entanto, em estudos de Um *et al* (2002) observou-se que a expressão do gene E6 inibiu moléculas sinalizadoras de IFN, como as proteínas STAT 1 e 2, conhecidas por ativarem essa via de sinalização através da fosforilação. Além disso, quando E7 foi expresso

levou-se a uma baixa regulação do fator regulador de interferon (IRF - *Interferon regulatory factor*).

É sabido que nos Delta-papilomavírus a expressão do gene E6 que ao ligar-se à p53 promove a proliferação celular por estimular a degradação desse supressor tumoral, aliado a sua cooperação entre os demais oncogenes E5 e E7 contribui para transformação celular induzida pelo vírus. A oncoproteína E7 possui capacidade de ligar-se a uma região específica da proteína p600 e impedir sua atividade normal de supressão dos fatores de transcrição E2 virais, permitindo assim a replicação viral (Corteggio *et al*, 2011; Yim e Park, 2005).

2.6.2 Imunidade Adaptativa

Imunidade celular - As células dendríticas – (DC – *Dendritic Cell*) são células apresentadoras de antígenos (APC - *Antigen Presenting Cell*) que geram a chamada resposta celular através da captura e apresentação de antígenos virais. Existem diferenças fenotípicas e funcionais entre as DCs e as Células de Langerhans (LC – *Langerhans cells*). As LCs produzem baixos níveis de TLRs e são capazes de promover resposta de células T CD8⁺ via interleucina 15 (IL-15). As células DCs expressam também TLRs, e, além disso, produz IL-1 α , TGF- β , IL-10, IL-12, GM-CSF, IL-6 and IL-8. O conjunto desses componentes gera uma efetiva resposta imune celular contra o papilomavírus (Molina *et al*, 2013). Dentro desse contexto, um dos primeiros estudos realizados utilizando a proteína E7 como vacina apresentou regressão do crescimento de papilomas em bezerros, aliado a forte ativação de células T específicas (Campo *et al*, 1993). A outra oncoproteína, E5, possui a habilidade de ligar-se a subunidades c da ATPase vacuolar (16 kDa) e formar um complexo estável capaz de modificar o pH de organelas como o aparato de Golgi (Roperto *et al*, 2014). Essa interação ocorre por meio de ligações entre a Glutamina 17 da proteína E5 e o ácido glutâmico da ATPase transmembranar levando a dificuldades no tráfico intracelular e posterior apresentação do antígeno para o MHC I e MHC II (Ashrafi *et al*, 2005). Além disso, sua

atividade repressora da transcrição da cadeia pesada do MHC I contribui para evasão do sistema imune. Entretanto, as características de E5 a tornam uma forte aposta para vacinas terapêuticas que visam regressão de tumores estabelecidos (DiMaio e Petti, 2013)

Após a ativação do sistema inato, seus efetores podem levar a uma resposta imune adaptativa adequada ao patógeno. Isso ocorre, pois as APCs apresentam os antígenos virais ao complexo de histocompatibilidade II – (MHC – *major histocompatibility complex*) que ativam células T, o que gera a secreção de diversas proteínas que auxiliam na sinalização da resposta imune. A liberação de citocinas pelas APCs é primordial para uma ponte entre imunidade inata e adaptativa, sendo muito importante para vacinas terapêuticas (Stanley, 2005).

Imunidade humoral - Os linfócitos B se desenvolvem nos ossos e entram em sua forma madura no sangue, e se encontram nos órgãos linfoides com os antígenos. Em um primeiro encontro dos linfócitos B e as partículas virais, leva a diferenciação de algumas dessas em anticorpo IgM e mais tarde na mudança de classe para anticorpos de alta afinidade, como o IgG antiviral. Esses anticorpos produzidos podem então neutralizar e remover as proteínas virais, formando complexos que são conduzidos ao sistema de células fagocitárias ou as células NK – *natural killer* (Peakman e Vergani, 1999).

Em um segundo encontro, a resposta secundária é produzida de forma mais rápida e com uma maior afinidade ao antígeno viral. Diferente das células T, os linfócitos B reconhecem a conformação das proteínas virais naturais, sem a necessidade do processamento, no entanto, apenas alguns antígenos são os ideais para ativação dos linfócitos B e produção de anticorpos específicos, o que torna essas informações de muita valia para produção de vacinas profiláticas (Stanley, 2005).

2.7 VACINAS DE DNA

Nos últimos 20 anos, o DNA plasmidial tem sido utilizado para expressão de antígenos em estudos que visam avaliar a sua capacidade de induzir respostas imunes em

diversos modelos animais. Alguns trabalhos pioneiros envolvendo a temática eram baseados na vacinação de camundongos quando injetados em tecidos musculares (Tang *et al*, 1992). A primeira vacina de DNA foi relatada por Wolff *et al*, em 1990, no experimento que inoculou o plasmídeo que continha o gene repórter da enzima β -galactosidase e que foi codificado em músculo de camundongos, o que possibilitou a observação da transfecção do gene após a inoculação. Com base nisso, diversos estudos foram realizados na tentativa de avaliar a expressão de proteínas imunogênicas e suas respostas protetoras e/ou terapêuticas.

O vírus Influenza foi objeto de estudo para avaliação da capacidade de epítomos de proteínas virais clonados em plasmídeos que ao serem inoculados em camundongos da linhagem BALB foram capazes de gerar altos níveis de títulos de anticorpos, o que também sugeriu que o antígeno viral estava sendo processado e entregue a molécula MHC de classe I e II (Ulmer *et al*, 1993). Entretanto, outro estudo realizado por MacGregor *et al* (1998) também auxiliou a respeito do entendimento da eficácia da vacina de DNA, que teve como alvo o vírus da imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) com foco terapêutico e preventivo da doença, e que demonstrou segurança na plataforma, no entanto, evidenciou baixos níveis da imunogenicidade. Entretanto, este trabalho realizado demonstrou que a baixa resposta imunológica elicitada estaria ligada a ineficiência das transfecções e seria um dos principais fatores limitantes da aplicabilidade em terapia gênica do material genético plasmidial como vacina profilática ou terapêutica.

Esses primeiros resultados a respeito da indução de respostas profiláticas ou terapêutica após transfecção com vacinas de DNA levaram ao aumento do interesse pela plataforma por parte da comunidade científica, e a busca por melhorias na atuação das mesmas (Liang *et al*, 2000)

Com intuito de aperfeiçoar os resultados obtidos até então, algumas modificações nas construções plasmidiais levaram a chamada segunda geração de vacinas de DNA que

possuem um melhor desempenho na resposta imune celular e humoral. Os principais ajustes realizados estão relacionados ao aumento da disponibilidade de novas metodologias para entrega dos vetores plasmidiais, a otimização do desenho dos antígenos, como por exemplo, a adição de sítios consensos e a escolha de regiões mais imunogênicas, e o uso de adjuvantes moleculares (Ferraro *et al*, 2011).

Desde o início das pesquisas com vacinas de DNA muitas informações a respeito da técnica foram investidas em pesquisas que propuseram tratamento e profilaxia de doenças que acometem os animais. Tais indícios resultaram nas quatro vacinas de DNA formuladas e licenciadas para o uso em animais, evidenciando que a combinação das melhorias propostas para as vacinas de nova geração, bem como respostas imunogênicas aprimoradas são possíveis, e que, portanto, existe de fato um potencial comercial (Kutzler e Weiner, 2008).

Uma das mais recentes vacinas de DNA foi liberada no ano de 2007 nos Estados Unidos para uso na terapia gênica e utilizada para tratamento do melanoma maligno oral de cães, que é baseada em um gene da família das tirosinases, importante na síntese de melanina. Nessa vacina é utilizado um gene xenogênico capaz de elicitar resposta imune específica anti-tirosinase e resposta imune de caráter terapêutica, e para última, excelentes resultados são obtidos nos estágios II/III da doença (Bergman e Wolchok, 2008).

Outras três vacinas são encontradas disponíveis no mercado, uma delas é contra infecção pelo vírus que acarreta na chamada doença do Oeste do Nilo, que acomete o cavalo, e teve sua licença liberada no ano 2005 no EUA (Davidson *et al*, 2005. Kutzler e Weiner, 2008) além da vacina contra a infecção pelo vírus da necrose hematopoiética em salmão com licença liberada também no ano 2005 no Canadá (Garver *et al*, 2005. Kutzler e Weiner, 2008) e a mais recente das vacinas de DNA elaborada para estimular a produção de hormônio de crescimento em porcos e outros animais, com licença liberada em 2007 na Austrália (Thacker *et al*, 2006. Kutzler e Weiner, 2008).

Recentemente, novas vacinas estão sendo desenhadas com a finalidade de induzir respostas contra alvos específicos, como por exemplo, em Chen et al, 2016, na qual o plasmídeo recombinante de multiepítopos codificante para 15 imunógenos derivados das proteínas não estruturais do (DENV-1 Dengue Vírus 1) foram capazes de gerar resposta de linfócitos T citotóxicos em camundongos.

2.8 A PROTEÍNA E5 COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA VACINAL

Além das oncoproteínas E6 e E7, o papilomavírus bovino codifica outra oncoproteína denominada E5 que possui 44 aminoácidos, cuja ORF encontra-se no final da região precoce no genoma viral. A proteína é dividida entre dois domínios, um fortemente hidrofóbico e que funciona como ancora e outro hidrofílico que interage com proteínas reguladoras importantes da célula.

O domínio hidrofóbico é o amino-terminal situado entre os resíduos 1 e 32, e dentro dessa região há ainda a presença de um único resíduo hidrofílico. Esse único resíduo hidrofílico, na posição 17 pode ser uma glutamina quando se trata da E5 do BPV-1 e asparagina para o BPV-4. O segundo domínio é o hidrofílico, na porção carboxi-terminal, entre os resíduos 33 e 44 (Xu *et al*, 1993. Venuti *et al*, 2011. Corteggio *et al*, 2013).

A proteína E5 existe na forma de dímeros, devido à formação das ligações dissulfeto entre os seus resíduos de cisteína da porção carboxi-terminal das proteínas. A proteína E5 são localizadas principalmente nas membranas do aparato de Golgi e do retículo endoplasmático (RE) (DiMaio e Mattoon, 2001) (Figura 10).

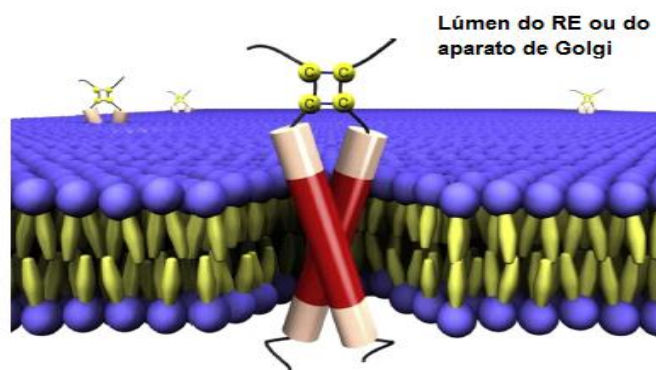


Figura 9: Esquema representando o dímero de E5 de BPV 1. A proteína E5 localizada em uma membrana celular, com seu domínio C-terminal voltado para o lúmen do retículo endoplasmático (RE) ou do aparato de Golgi (adaptado de DiMaio e Petti, 2013).

Mesmo sendo pequena, sua composição hidrofóbica permite uma conformação estável para interações com outras proteínas. É sabido também que, na presença de agentes redutores ou em casos de mutação, seus dímeros podem ser convertidos a monômeros. Além disso, é classificada como uma proteína de transmembrana tipo II, e sua porção C-terminal está voltado para o interior de ambientes não redutores, como o interior do lúmen do aparato de Golgi ou do RE, e não para ambientes redutores como o citoplasma. Esse posicionamento permite a proteção dessas ligações dissulfeto entre suas cisteínas, e com isso, consequentemente leva a estabilização dos dímeros formados (DiMaio e Petti, 2013).

2.9 ATIVIDADE TRANSFORMADORA DE E5

A proteína E5 do BPV é conhecida por desempenhar um papel importante na indução da transformação morfológica e formação de tumores, o que é devido a sua ligação ao receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF β -R - *platelet-derived growth factor β receptor*) e que leva a sua ativação constitutiva. Isso acontece porque E5 interage com o receptor PDGF β , pelos seus domínios de transmembrana, onde se situa a glutamina (Gln 17), e que além sua importância para a dimerização de E5, revela se importante para a interação e ativação do receptor – PDGF β . Outro domínio importante de E5 para ativação do

receptor é o resíduo asparagina (Asp 33) da região de justamembrana. Os resíduos de cisteínas, que também são importantes para formação homodímeros de E5, se mostram também necessários na interação com o receptor (Venuti *et al*, 2011). Os complexos estáveis de E5 que são formados, não possuem atividade enzimática ao se ligarem ao PDGF β -R, mas, assim como o fator de crescimento natural das células - PDGF β , também podem levar a dimerização do receptor, devido à autofosforilação dos resíduos de tirosina que estão presentes nas suas subunidades. A cascata de sinais gerada, consequentemente leva a proliferação celular. Portanto, a ativação constitutiva do PDGF β -R é devido a sua estimulação via transfosforilação induzida por E5 (DiMaio e Mattoon, 2001; Schapiro *et al*, 2000) (Figura 11).

Além do papel transformante, a proteína E5 pode interferir negativamente na expressão do MHC classe I, tanto em HPV quanto em BPV, o que evidencia o papel importante de E5 na evasão do sistema imune, logo no início do processo de infecção e demonstra sua importância como alvo de pesquisas (Venuti *et al*, 2011).

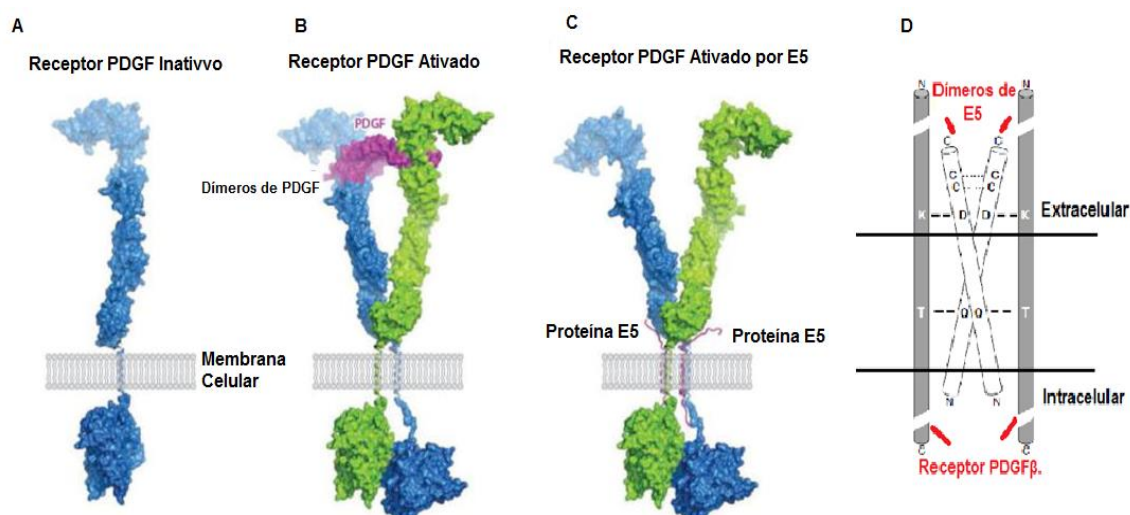


Figura 10: Interação da proteína E5 com o Receptor – PDGF β . A. Modelo representativo da interação de E5 com o Receptor – PDGF β . No diagrama do meio, a porção extracelular do dímero do receptor está ligada a PDGF β . À direita, dímero de E5 ligado ao receptor – PDGF β . A fosforilação da tirosina leva a formação dos dímeros do receptor - PDGF β , assim como o recrutamento de substratos sinalizadores mostrado em (verde) e (lilás). B. Modelo de interação entre os dímeros de E5 (cilindros em branco) e dímeros do receptor – PDGF β (cilindro cinza) apresentando a porção COOH-terminal (Meio Extracelular) e porção NH₂ (Meio Intracelular) (Adaptado de DiMaio, 2014; Freeman-Cook e DiMaio, 2005).

A maioria dos estudos com E5 foram realizados *in vitro*, Leptak *et al* (1991) apresentou que E5 do HPV 16 não levou a ativação transformadora de fibroblastos, mas sim, em cultura de células de queratinócitos de murinos. No entanto, células transfectadas com E5 de BPV induziram tumorigenicidade dos fibroblastos. Com isso, demonstrando que a proteína E5 pode exibir um papel importante no tropismo celular durante a infecção natural.

Em outro estudo de Borzacchiello *et al* (2006) foi demonstrado tanto a co-localização quanto a interação entre a oncoproteína E5 e os receptores PDGF β . Além disso, a vacinação de camundongos com E5 de HPV 16 foi capaz de produzir resposta de linfócitos T citotóxicos capaz de inibir o desenvolvimento de tumores (Chen *et al.*, 2004). Todos esses estudos apontam que E5 pode ser usada como alvo vacinal terapêutico, e também servir como modelo de tratamento para a forma infecciosa humana do vírus. Apesar da oncoproteína E5 de HPV ser muito estudada, ainda existe uma carência de trabalhos tendo como alvo E5 de BPV (Campo, 2002).

2.10 A PROTEÍNA L2 COMO ESTRATÉGIA PROFILÁTICA VACINAL

A proteína L2 possui aproximadamente 500 aminoácidos e encontra-se ligada ao genoma viral (Figura 11) (Wang e Roden, 2013), mas Rippe e Meike (1989) detectaram L2 de BPV 2 com peso aproximado de 64 kDa, enquanto a mesma proteína de HPV foi observada com pesos de 70 e 74 kDa. No entanto, produtos gênicos de L2 clonados em *Escherichia coli* apresentaram mesmo perfil de migração, com 64 kDa, revelando que as modificações pós traducionais podem não estar envolvidas no processo.

Além das alterações conformacionais, sabe-se que L2 também está envolvida na ruptura da membrana endossomal e favorece o tráfico do genoma do vírus até o interior do núcleo celular, em fases iniciais do processo infeccioso (Wang e Roden, 2013).

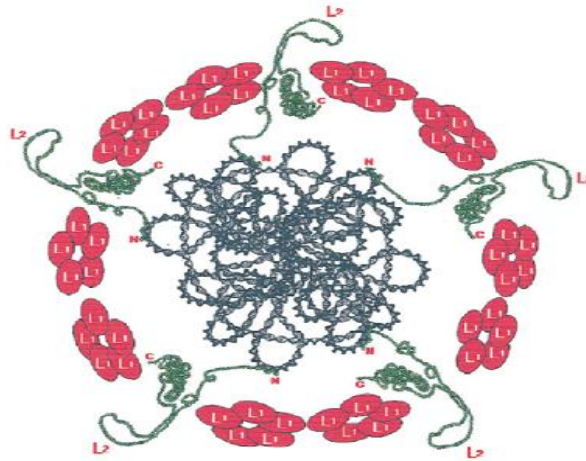


Figura 11: Capsídeo viral. Representação do capsídeo viral contendo as proteínas L1 (vermelho) e L2 (verde) ligada ao genoma do BPV (adaptado de Liu et al., 1997).

Outro aspecto importante de L2, é que em sua região amino-terminal existem sequências conservada entre as formas que infectam tanto humanos como animais, o que não é observado nas sequências de L1 (Karanam *et al*, 2009) (Figura 12).

Recentes estudos apontam que alguns epítomos conservados de L2 induzem uma proteção cruzada entre espécies diferentes de PVs, através da resposta de anticorpos neutralizantes. Por essas características, os epítomos de L2 são atrativos para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra a infecção adquirida por BPV em gados e um modelo experimental para HPV. Entretanto, deve-se ressaltar que esses epítomos demonstram baixa imunogenicidade quando comparados com sequências de L1 (Li *et al*, 2016).

Proteína L2 do Papilomavírus

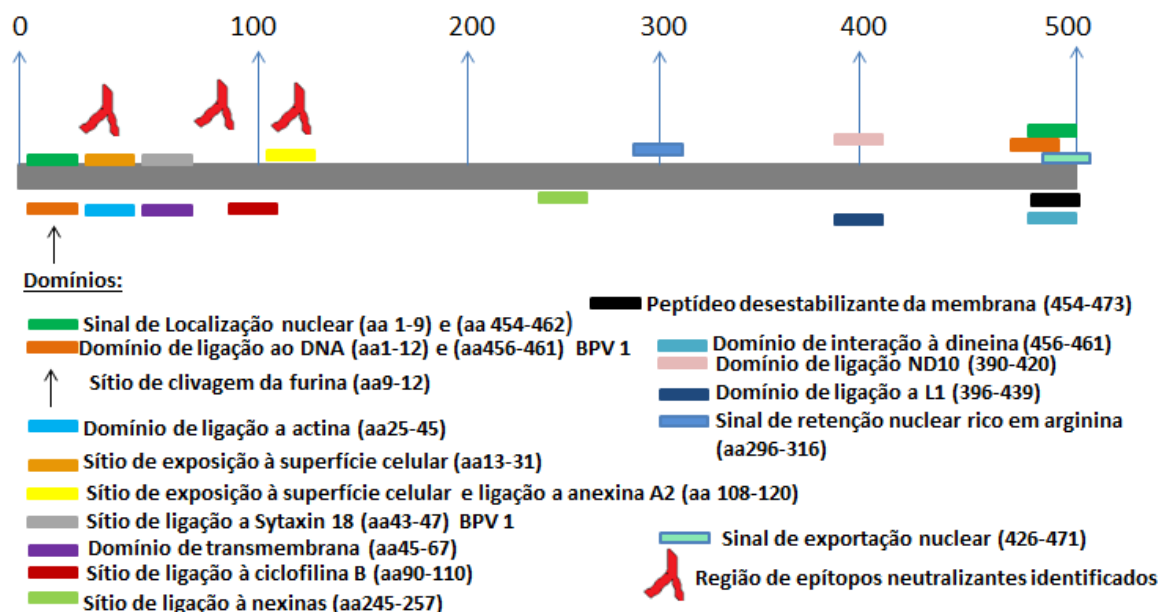


Figura 12: Diagrama apresentando os epítomos neutralizadores de L2. A imagem aponta os epítomos neutralizadores mais conhecidos e os domínios de interação de L2 mais conhecidos (Adaptado de Wang e Roden, 2013).

Um estudo com as regiões 1 a 88 de aminoácidos de L2 de BPV elicitou resposta imune capaz de neutralizar HPVs do tipo 11, 16 e 18. Já os epítomos 11 a 200 testados em coelhos evidenciaram os melhores resultados em proteção cruzada contra os tipos 16, 18, 5, 31, 45, 52, 58 de HPV e BPV 1 (Pereira *et al*, 2009).

Ainda na região N-terminal, especificamente entre os aminoácidos 17 e 36, encontra-se uma forte região para o reconhecimento de anticorpos, isso devido a existência de resíduos de cisteínas (C22 e C28) que são altamente conservados entre as espécies de PVs (Figura 13). Além do mais, estudos apontaram que mutações pontuais nesses resíduos originaram virions não infecciosos, mas, as mesmas mutações não foram capazes de interferir na formação do capsídeo viral (Wang e Roden, 2013)

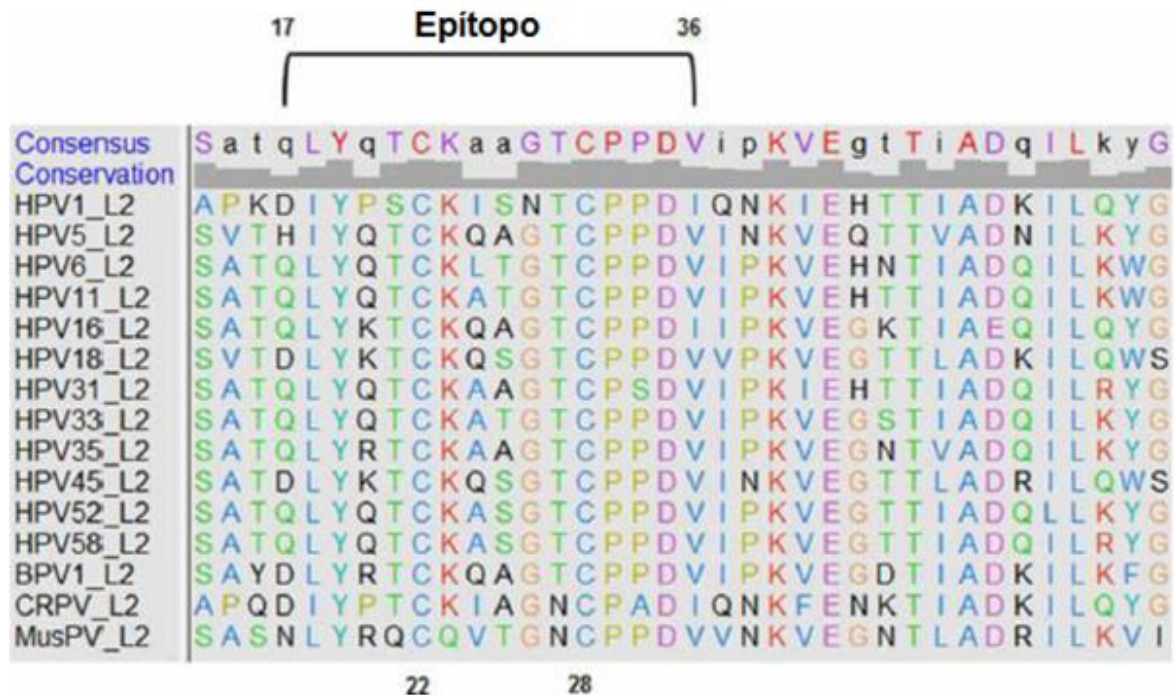


Figura 13: Regiões de alta conservação de L2. Região fortemente conservada (17-36 aa) e de reconhecimento para anticorpos neutralizantes entre diferentes tipos de PVs. Em baixo, os números identificam os resíduos de cisteínas (C22-C28), fortemente conservado entre os PVs apresentados (Adaptado de Wang e Roden, 2013).

Muitos dos estudos realizados com L2 foram baseados em partículas virais semelhantes a vírus (VLPs - *Virus-like particles*), que são estruturas proteicas que mimetizam a organização estrutural do vírus, mas não possuem o genoma viral, o que os tornam mais seguros e diminui o custo de produção de vacinas (Roldão *et al*, 2010). No trabalho de Kimbauer *et al*, (1996) a vacinação intramuscular em bezerros utilizando VLPs L2 de BPV 4, ou somente utilizando a porção N-terminal foi suficiente para elicitar resposta humoral e prevenir a formação de papilomas.

Recentemente, estão disponíveis vacinas profiláticas contra a infecção pelo HPV cervical baseada em VLPs de L1 do HPV, como por exemplo, a Gardasil uma vacina quadrivalente contra os tipos virais de HPV 6, 11, 16 e 18, comercializada pela Merck, EUA. Apesar de apresentar resposta satisfatória, a produção de vacinas baseadas em VLPs possui custo elevado, e as já disponíveis no mercado proporcionam uma proteção tipo específicas (Wang e Roden, 2013).

Apesar de L2 não apresentar epítomos tão imunogênicos, incrementos vêm sendo realizados com a finalidade de aumentar imunogenicidade dessas construções, como por exemplo, repetições de epítomos de diversificados sorotipos virais e inclusão de repetições de sequências conservadas que induzem resposta cruzada, além da utilização de VLPs de bacteriófagos que possibilita apresentação dos epítomos de L2 aumentando a exposição do antígeno vacinal para o sistema imune, e consequentemente os níveis de resposta humoral (Li *et al*, 2016).

Entretanto, a vacina de DNA conduz a respostas humorais e celulares, devido às últimas melhorias no desenvolvimento dessas vacinas, como a códon otimização, melhorias na formulação dos plasmídeos disponíveis, e no auxílio da resposta imune pela adição de sítios adjuvantes. Além do mais, vacinas de DNA possuem um custo de produção mais baixo em larga escala, podendo ser produzida em um curto período de tempo e sua estabilidade a temperatura ambiente facilita questões de distribuição comercial (Lima *et al*, 2014).

Em um recente estudo de Yang *et al* (2015), foi demonstrado que a vacina de DNA contendo E7 de HPV 16 ligado a um adjuvante calreticulina (CRT – *calreticulin*) quando co-administrada junto a uma outra vacina de DNA contendo L2 de BPV 1, potencializou as respostas de anticorpos neutralizantes e de células T CD4 +. Esses dados fortalecem o uso das proteínas L2 e E5, demonstrando que elas são possíveis alvos candidatos à vacina profilática e terapêutica, respectivamente, contra a infecção promovida pelos diversos PVs.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver construções vacinais baseadas nos genes E5 e L2 do BPV, e avaliar a sua expressão em células de mamíferos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter plasmídeos para expressão em células de mamíferos baseados nos genes L2 e E5;
2. Avaliar a atividade das construções candidatas a vacina de DNA através da cultura de células de mamíferos (HEK-293);

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMPLIFICAÇÃO E DESENHO DOS GENES L2 E E5

Utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) os genes E5^{wt}, L2^{wt} e L2¹¹⁻²⁰⁰ foram amplificados a partir do genoma completo de BPV 2. Com uso de primers específicos foram adicionados os sítios para a enzima de restrição *EcoRI*, a sequência *Kozak* que auxilia na tradução de proteínas em eucariotos e seis aminoácidos de histidina para futura detecção imunológica da proteína à *montante* dos respectivos genes. Também foi adicionada à *jusante* dos genes, nesta ordem, a Tag-HA para detecção imunológica da proteína, códon de parada e os sítios para enzimas de restrição *XbaI* e *NotI* (Figura 14). Totalizando um tamanho molecular de 1400 pb para o gene selvagem L2, 647 pb para o gene L2 (região 11 a 200 dos aminoácidos) e 208 pb para o gene E5 (selvagem) ambos para do BPV 2.

O gene sintético E5 códon otimizado foi produzido pela empresa *Epoch Biolabs* (USA), sequência essa correspondente tanto para BPV1 quanto BPV2, pois ambos os tipos virais possuem entre si um grau de similaridade muito alto (92%) quando observado o alinhamento de suas sequências. A códon otimização para o gene E5 foi realizada de acordo com os códons preferenciais das células de mamífero. Dentre as modificações realizadas, um número de 38 substituições de bases em 32 códons foi efetivado, no entanto, a troca de bases na trinca de nucleotídeos não implicou em nenhuma alteração nos 44 aminoácidos. Além disso, sabendo da importância do aminoácido conservado da glutamina 17 como principal responsável pela ação transformante da proteína E5, o mesmo foi substituído pelo aminoácido não-polar glicina, que em estudo de Sparkowski *et al*, (1994) demonstrou excluir a atividade biológica do gene E5. Uma vez que o objetivo final do trabalho é a construção de uma vacina de DNA, utilizando o gene E5 como agente imunizante, não necessitando de sua ação transformante.

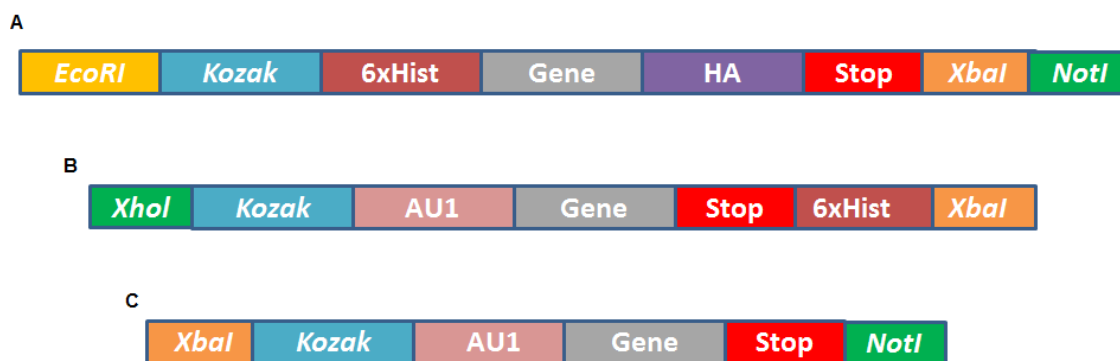


Figura 14: Esquema da construção dos genes. **A)** Genes E5^{wt} e L2¹¹⁻²⁰⁰ **B)** Gene L2^{wt}. Adição dos sítios com auxílio dos pares de *primers* – *forward* e *reverse*. **C)** Gene E5 sintético códon otimizado.

Para reação de PCR do gene L2, foi utilizada *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (InvitrogenTM). Com uma temperatura de Anelamento de 65 ° C. As seguintes etapas foram utilizadas: desnaturação inicial a 95°C por 5'; 30 ciclos de 94°C por 30'', 65°C por 40'' e 72°C por 1' e para extensão final a temperatura utilizada foi de 72°C por 5' , para PCR do gene E5 houve apenas uma mudança na temperatura de anelamento do gene para 57°C.

4.1 CLONAGEM PGEM-T-EASY

Os genes de trabalho L2 e E5 foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega[®]) e então ligados ao vetor pGEM-T Easy (Promega[®]) (Ver Figura 16) com o uso da T4 ligase (Promega[®]), após as 16 horas de incubação à temperatura de 4°C, os respectivos produtos da ligação foram utilizados para transformação de células de *Escherichia coli* linhagem *DH5α*, tratadas de acordo com o protocolo de Sambrook et al., (1989).

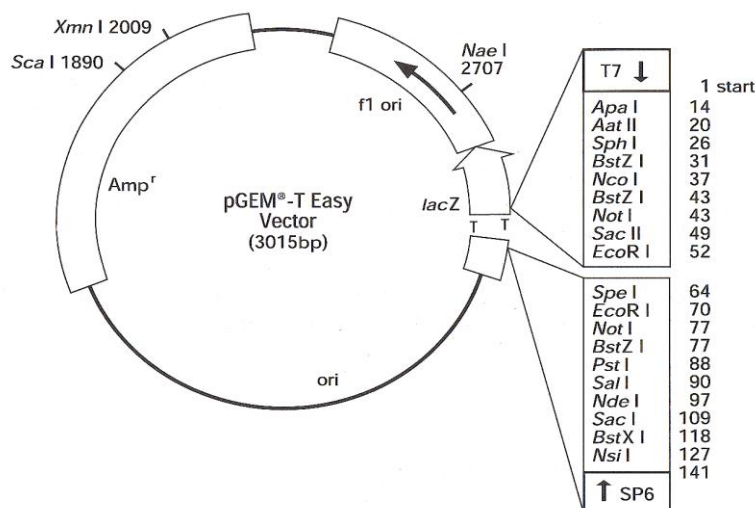


Figura 15: Mapa do vetor circular pGEM-T Easy (Promega®).

4.2 TRANSFORMAÇÃO

Para realização da transformação, 10 ng de DNA e 50 µL das células competentes *Escherichia coli* linhagem DH5α foram incubados no gelo por 30min e levados ao termobloco para choque térmico a 42°C por 5 min. Em seguida, os microtubos ficaram 1 minuto no gelo logo então, foi adicionado 1 mL do meio Luria Bertani (LB) para recuperação das células por 1 hora a temperatura de 37°C. Após, as células foram centrifugadas por 10 min a 1200 rpm, descartando-se 700 µL e homogeneizando-se o pellet restante. Para realização do plaqueamento usou-se placas com LB e ampicilina a uma concentração final de (100 µg/mL) que foram semeadas com 300µL de células, para crescimento dos transformantes por 16 horas à 37 °C.

Após realização dos repiques das colônias encontradas, os possíveis recombinantes foram então analisados quanto à presença das construções pGEM-L2 e pGEM-E5, por meio de extração plasmidial e digestão enzimática com as enzimas *EcoRI/NotI* e *EcoRI/XbaI* respectivamente, para cada construção quanto a presença do inserto.

4.3 MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para as etapas de transformação, repique e inóculo foi utilizado o meio de cultura Luria-Bertani (LB) que apresenta a seguinte composição: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%, adicionando 100 µg/mL de Ampicilina. Para meio sólido, foi acrescentado 1,5% de ágar.

4.4 LISE CELULAR

A extração plasmidial foi realizada segundo o protocolo de *Sambrook*, (1989). O crescimento das culturas bacterianas foi em 5 mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) à 37°C por 16 horas. Logo após, foram feitas três centrifugações da cultura em tubo de 1,5mL por 3min, a 13000rpm à temperatura ambiente. O *pellet* bacteriano obtido foi ressuspensionado em 100 µL da Solução I gelada (glicose 100mM, Tris-HCl 50mM pH 8, EDTA 20mM pH 8) passando pelo vórtex e posteriormente, inversão com 200µL da Solução II (NaOH 0,2N e SDS 1%) com a finalidade de lisar a célula. Para a solução III (acetato de potássio 5M, ácido acético glacial e água destilada) foi então adicionado (150 µL), com a finalidade da precipitação de proteínas e do DNA genômico, e mantido no gelo por 5 minutos. Seguida de uma centrifugação a 14000 rpm, por 5 minutos, para recuperação do sobrenadante e passagem para novo tubo. Foi acrescentado 1 volume de Isopropanol a temperatura ambiente e centrifugado a 14000 rpm, 5 minutos. Em seguida o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de etanol 70% gelado, e o tubo foi invertido para lavagem seguida de uma nova centrifugação por 5min. Depois do descarte do sobrenadante e a devida secagem do pellet na estufa à (37°C), o mesmo foi ressuspensionado em 30 µL em água Nuclease-free junto à RNase (20 µg/mL), incubado por 30 min a 37°C e o armazenamento se deu à -20°C.

A digestão enzimática dupla foi realizada com a finalidade de reconhecer os clones recombinantes por meio da visualização de bandas específicas para cada gene de trabalho.

4.5 DIGESTÃO E LIGAÇÃO NO VETOR DE EXPRESSÃO PCI-NEO

Os genes L2 e E5 foram liberados a partir do vetor pGEM-T-easy por digestão dupla com as respectivas enzimas de restrição *EcoRI*/NotI e *EcoRI*/XbaI (20U/μL, Promega®), por 16 horas à 37°C. A purificação dos insertos foi realizada utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®). O vetor pCI-neo (Promega®) (Figura 16) também foi previamente digerido com enzimas de restrição respectivas para cada inserto a ser ligado. Depois, os produtos da purificação foram ligados ao vetor pCI-neo, com auxílio da T4 ligase, por cerca de 16 horas à 4°C, gerando as construções pCIL2^{wt} (Gene selvagem), pCIL2¹¹⁻²⁰⁰ (epítipo 11-200), pCIE5^{wt} (Gene selvagem) e pCIE5^{oti} (Gene códon-otimizado).

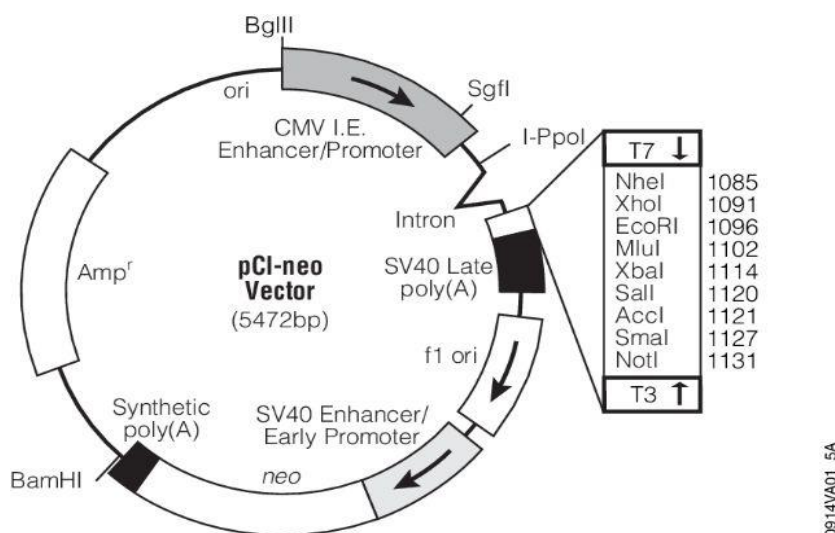


Figura 16: Mapa do Vetor de Expressão em Mamíferos pCI-neo (Promega®).

Novamente os produtos gerados pela ligação foram usados para a transformação. E, então, plaqueadas em meio sólido LB para crescimento e repique das colônias.

Para análise dos clones, novamente utilizou-se da extração plasmidial com o kit (Promega) seguido da análise por digestão enzimática, com as respectivas enzimas. Tanto as extrações como as digestões foram visualizadas em gel de agarose, além disso, o sequenciamento foi realizado.

4.6 ELETROFORESE DE DNA

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

4.7 SEQUENCIAMENTO DAS CONSTRUÇÕES

O sequenciamento foi realizado para todas as construções plasmidiais pGEME5^{wt}, pGEML2^{wt}, pGEML2¹¹⁻²⁰⁰, pCIE5^{wt}, pCIE5 códon-otimizado, pCIL2^{wt} e pCIL2¹¹⁻²⁰⁰ em concentração de 100ng para cada reação. Os primers específicos para os vetores pGEM-T-easy e pCI-neo e foram usados na concentração de 15pmol, com a finalidade de flanquear os respectivos genes de interesse e, com isso verificar a matriz de leitura. Todo o sequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento do Centro de Biociências utilizando o sequenciador automático de DNA de acordo com os padrões previamente estabelecidos nesta unidade. As sequencias resultantes foram analisadas com auxílio dos programas Mega 6.0 e *BioEdit*.

4.8 CULTIVO, TRANSFECCÃO E LISE DAS CÉLULAS HEK – 293

Para a etapa da transfecção as células eucarióticas escolhidas (HEK 293 - *Human embryonic kidney cell* – Célula embrionária de rim humana) foram crescidas utilizando o meio DMEM - *Dulbeccos Modified Eagles Medium* com adição de: 10%, soro fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina para manutenção celular e durante todo o processo elas foram incubadas à 37°C em estufa à 5% de CO₂. Ao atingir uma confluência aproximada entre 40-70% (1x10⁵), o procedimento de contagem e observação da viabilidade das mesmas foram realizados via análise pelo software *Vi-Cell XR*.

Seguindo o protocolo de transfecção (*PolyFect Transfection* - Qiagen®) as células HEK 293 foram transfectadas com as respectivas construções de trabalho, para uma expressão transiente, sem uso de antibióticos para seleção de células. Os lisados dos respectivos tipos celulares, sem a transfecção de nenhuma construção foram utilizados como controle negativo. Para cada reação, foram adicionados 4µg de construção, 150 µL de meio de crescimento (DMEN) sem soro, proteínas e antibióticos, além de 20 µL de *PolyFect Transfection*, misturados por pipetagem. E, então as amostras foram incubadas durante 20 minutos o que permitiu a formação dos complexos. Em seguida, utilizando garrafas de crescimento celular T-25, com células previamente aderidas, foi adicionado em cada garrafa 1mL do complexo formado. Após 4 horas da transfecção, 4 mL do meio DMEN (Contendo antibióticos e soro 10%) foi adicionado.

Após 72 dias de cultivo das células HEK 293, o meio DMEM foi retirado, e o cultivo celular lavado 1X com 1mL de PBS estéril. Os referentes volumes foram divididos para futura extração total de RNA e lise proteica. Em seguida, para lise celular foi adicionada uma solução com concentração final de 1x (Passive Lysis Buffer 5x – Promega) e o inibidor de protease (PMSF 10 mM). E, posteriormente, o volume referente a cada situação foi transferido para microtubo de 1,5mL e em seguida centrifugado (12000 rpm; 10 minutos) os sobrenadantes e os pellets foram recuperados e transferidos para novos microtubos e mantidos a -80 °C.

4.9 PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Os extratos totais das amostras contendo o epítipo 6xHis obtidos a partir da lise celular foram purificados de acordo com o protocolo (Ni-NTA Spin Kit-Qiagen). Além disso, todos os demais extratos celulares foram quantificados utilizando o método Bradford, (1976), para determinação do rendimento proteico total.

4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE E5 E L2

4.10.1 Extração do RNA total das células HEK 293

As células foram cultivadas e transfectadas em garrafas T-25, nas condições já descritas. Além das amostras transfectadas, uma garrafa a mais foi utilizada como controle negativo de transfecção (somente células Hek-293 não transfectadas). Após 72 horas da transfecção o meio DMEN e o material lavado uma vez com PBS diluído a 1X e estéril, também foi acrescentado a tripsina e posteriormente 1 ml de meio DMEN completo para inativação da mesma. O volume referente a cada situação foi dividido para destinos diferentes, primeiramente a extração de RNA total e após também foi realizada a outra etapa de lise proteica.

Para realização da extração do RNA, o volume referente a 1,5 ml de cada situação foi transferido para novos tubos e seguiu-se para a extração do RNA de acordo com as instruções do *RNeasy Mini Kit* (Qiagen). Todas as amostras foram tratadas com DNaseI (Qiagen) também seguindo instruções do fabricante.

4.10.2 Síntese de cDNA e RT-PCR

A etapa de construção do cDNA foi realizada de acordo com o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega). As amostras foram adicionadas para um volume final de 4µl de RNA para cada amostra (concentração final do RNA a 1µg), juntamente com 1µL do *primer* oligo DT 15 (Promega) e completados com água quando necessário, seguido de incubação à temperatura de 70°C por 5 minutos e, depois no gelo por 5 minutos. Em seguida, um mix contendo os reagentes detalhados na tabela 2 foi distribuído para cada amostra (15 µL do mix e 1 µL RNA) para incubação com ciclagem única a 25°C por 5', 42°C por 60', 70°C por 15' e 4°C por 2'.

Tabela 2: Reação para a transcrição reversa

Reagente	Volume
H ₂ O	7 µL
dNTP (10mM)	1 µL
MgCl ₂ (2mM)	2 µL
Tampão (5x)	4 µL
Transcriptase Reversa	1 µL
Total	15 µL

A amplificação foi realizada via RT-PCR (*Reverse-Transcriptase Polimerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa), utilizando-se os mesmos parâmetros da PCR, já citados anteriormente. Os *primers* utilizados para todos os genes de L2 foram para a região do epítipo, uma vez que se trata de uma região conservada nesse gene. Para os genes E5wt e E5 sintético códon otimizado, *primers* específicos para cada um deles foi utilizado.

4.10.3 Eletroforese e Imunodeteção de Proteínas

Para realização do gel, os *pellets* proteicos das amostras contendo a proteína E5 e o sobrenadante das amostras contendo a proteína L2 obtidos foram ressuspensos em e submetidos a condições desnaturantes, e alíquotadas no tampão *Laemmli* (L2x) (Tris-HCl 1M pH 6.8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.1%) e incubadas por 75°C durante 10 minutos. As amostras dos sobrenadantes foram diluídas em proporção 1:1 para um volume final de 100 µL utilizando o mesmo tampão e aquecidos à mesma temperatura. A avaliação da produção das proteínas foi inicialmente realizada por uma eletroforese em gel SDS-PAGE (12%) para detecção das proteínas L2 e outro gel a (15%) para proteína E5 utilizando tampão para corrida a 1X, com fonte a 200V e 25mA por 180

minutos. Depois de finalizada as corridas, os géis de poliacrilamida foram corados com *Coomassie Brilliant blue*.

A etapa de transferência das proteínas contidas no gel SDS-PAGE foi realizada em sistema semi seco, por 30 minutos a 25mA, para membranas de PVDF (*Polyvinylidene fluoride*, Millipore).

Os ensaios de *immunoblotting* foram realizados posteriormente, onde a membrana foi bloqueada em solução 5% leite em 1X PBS 0,05%Tween, incubada com o anticorpo monoclonal (1:5000) específico contra o epítipo AU1 (Membrana contendo proteína E5^{oti}), e incubada com anticorpo monoclonal específico contra o epítipo 6xHis conjugado a fosfatase (membrana contendo as proteínas L2^{wt}, L2¹¹⁻²⁰⁰, E5^{wt}) a 1 hora sob agitação, seguido de 3X lavagens (10 minutos cada) em PBS 1X e 0,05%Tween. Em seguida, a membrana incubada com anticorpo contra o epítipo AU1 foi incubada com anticorpo secundário (1:5000) anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Jackson ImmunoResearch®), 1 hora sob agitação, lavadas e reveladas utilizando a solução reveladora (TMB-BCIP® - Sigma), as demais membranas não foram incubadas com anticorpo anti IgG, e, portanto, foram reveladas após as 3 lavagens com solução de revelação (NBT- BCIP® - Sigma).

5 RESULTADOS

5.1 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES E5 E L2

A padronização das *PCRs* utilizando os pares de *primers* - *forward* e *reverse* resultou na formação de uma banda de aproximadamente 647 pb, demonstrando que estes *primers* são específicos para o gene L2 de BPV-2. Outros pares de *primers* foram utilizados para a padronização da PCR que amplificou o gene E5, também de BPV-2, evidenciando a formação de uma banda com cerca de 208 pares de bases, tendo como *template* o genoma completo de BPV-2. Além disso, foi adicionado de forma a flanquear os genes que foram amplificados, os sítios de restrição para as enzimas *EcoRI*, *XbaI* e *NotI*. Um sítio para sequência consenso

Kozak importante para expressão de proteínas em sistemas eucariotos também foi adicionado. Além das *Tags* - *6xHistinas* e *HA* que auxiliam na imunodetecção das proteínas traduzidas, e o códon de parada.

Após a amplificação, os genes L2wt, L2 (11-200) e E5wt foram purificados e ligados no plasmídeo de propagação *pGEM-T easy*, seguido do sequenciamento. A realização do sequenciamento possibilitou a observação de que a amplificação das sequências de E5 e L2 não apresentou nenhuma alteração em seus nucleotídeos, ou seja, nenhuma troca de bases na trinca, portanto, não implicou em modificações em nenhum dos aminoácidos. Para aumentar a quantidade do produto amplificado de E5, a *Nested-PCR* foi realizada, o que permitiu melhorar o desempenho da reação de ligação com o vetor em seguida. Entretanto, isso não foi necessário para os produtos gerados de L2 que logo após a purificação foram ligados ao vetor *pGEM-T easy*.

5.2 CLONAGEM DOS GENE E5 E L2

Depois de purificados os conjuntos de genes citados anteriormente de BPV 2 foram ligados ao vetor *pGEM-T Easy* (Promega) que possui 3.015 pb, em uma proporção de 5:1 para a ligação inserto: vetor. Para isso, todas as reações foram realizadas separadamente para cada gene de trabalho. A enzima *Taq* polimerase utilizada para amplificação inicial dos genes adiciona uma terminação de adenosinas em cada extremidade 3' dos amplicons e o vetor *pGEM-T*, por sua vez, possui nas suas extremidades 3' – T (terminações 3' de desoxitimina), aumentando assim a eficiência da ligação dos insertos ao plasmídeo e diminuindo as chances de ocorrer ligação entre as extremidades livres do vetor.

Depois, por choque térmico, as bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α foram transformadas com as construções *pGEM-L2wt*, *pGEM-L2* (11-200) e *pGEM-E5wt*. Em seguida, o plaqueamento foi realizado, e para auxílio na detecção das colônias o sistema de seleção Lac-Z foi utilizado. Isso é possível já que na presença do inserto clonado, as colônias geradas

não são capazes de metabolizar o X-gal e permanecem brancas. Essa seleção facilitou a identificação das colônias que possuíam as construções *pGEML2^{wt}*, *pGEML2¹¹⁻²⁰⁰* e *pGEME5^{wt}*.

Para confirmação da existência dos recombinantes nas colônias crescidas foi realizada a extração plasmidial, seguida da digestão com as respectivas enzimas de restrição para liberação dos insertos *L2^{wt}*, *L2¹¹⁻²⁰⁰* e *E5^{wt}* do vetor. As visualizações das respectivas digestões foram por eletroforese em gel de agarose a 0,8% e 1%, respectivamente, demonstrando as bandas geradas após liberação dos insertos clonados.

Uma vez estabelecida a clonagem dos genes de trabalho em vetor de propagação *pGEM-T easy*, uma nova corrida em gel de agarose foi realizada com intuito de purificar maior quantidade de insertos para subclonagem no vetor de expressão em células de mamíferos. Os genes de trabalho foram para isso cortados do gel e então purificados com uso do *Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e finalmente ligados ao vetor de expressão *pCI-neo* (Promega) que também foi purificado para reação de ligação dos insertos. Ambos os genes e o vetor *pCI-neo* estavam digeridos previamente com as respectivas enzimas adequadas para cada subclonagem. Nesta etapa, o gene E5 otimizado foi também digerido e ligado no vetor *pCI-neo*.

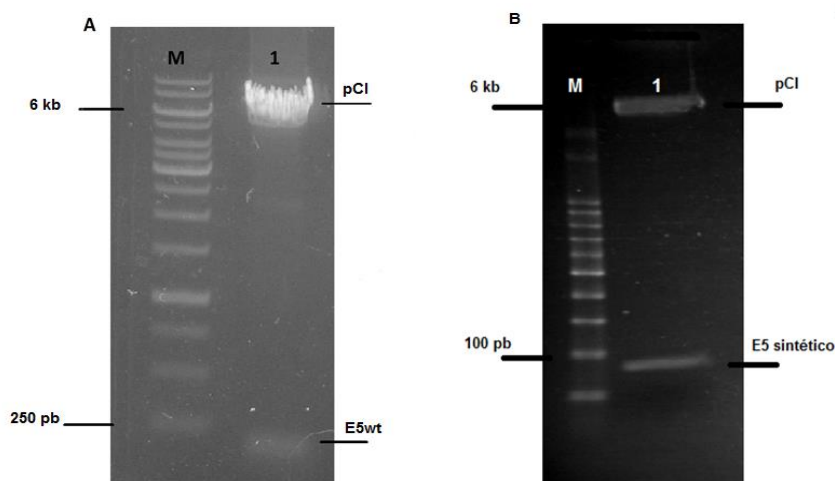


Figura 17: Digestão das construções pCIE5wt e pCIE5 sintético códon otimizado. **A)** Gel evidenciando a digestão de DNA plasmidial extraído da construção pCIE5wt. **M.** Marcador de corrida de 1Kb - (ThermoScientific). **1.** Construção pCIE5 digerida – banda gerada de E5 (208 pb). **B)** Gel evidenciando a digestão de DNA plasmidial extraído da construção pCIE5 sintético códon otimizado. **M.** Marcador de corrida de 100 pb (ThermoScientific). **1.** Construção pCIE5 sintético digerido – banda gerada de E5 (175 pb). Eletroforese em gel de agarose 1%, em TAE 1X e volume do produto aplicado em cada poço de 3µl. Voltagem 100V por 30 minutos.

A confirmação da formação das construções *pCIE5^{wt}*, *pCIE5^{OTI}* otimizado (Figura17) e *pCIL2wt* e *pCIL2(11-200)* (Figura18), foi novamente por digestões duplas utilizando enzimas de restrição. As enzimas *EcoRI* e *XbaI* foram usadas para liberação do gene *E5wt*, enquanto *EcoRI* e *NotI* foram usadas para liberação do gene *L2wt* e *L2* (11-200), para a liberação do gene E5 sintético *XhoI* e *NotI* foram utilizadas. Os fragmentos gerados no gel demonstraram as banda de tamanho aproximado ao do vetor *pCI-neo* que possui 5472 pb, enquanto a banda do gene *E5wt* possui cerca de 208 pb e o *E5* sintético cerca de 175 pb.

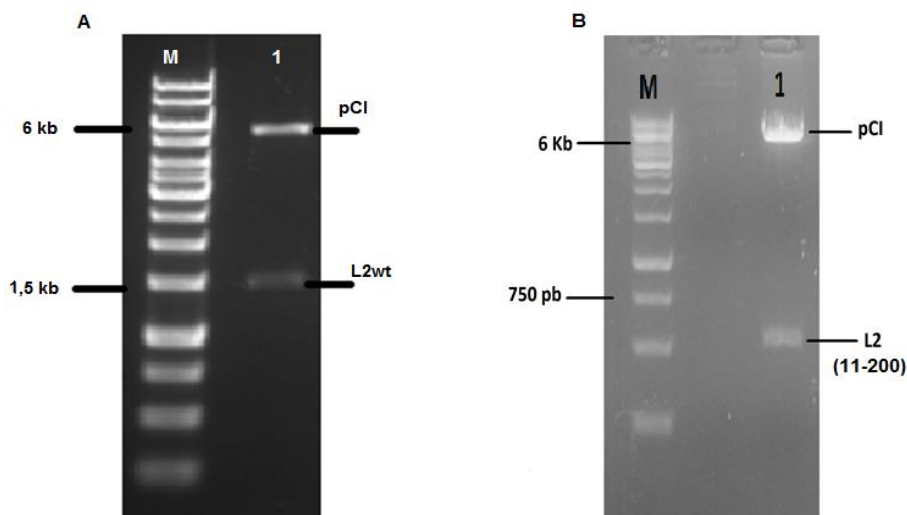


Figura 18: Digestão das construções pCIL2wt e pCIL2 (11-200) . **A)** Gel evidenciando a digestão de DNA plasmidial extraído da construção pCIL2wt. M. Marcador de corrida de 1Kb - (ThermoScientific). 1. Construção pCIL2wt digerida – banda gerada de L2 (1400 pb). **B)** Gel evidenciando a digestão de DNA plasmidial extraído da construção pCIL2 (11-200). M. Marcador de corrida de 1Kb (ThermoScientific). 1. Construção pCIL2 (11-200) digerida – banda gerada de L2 (647 pb). Eletroforese em gel de agarose 1%, em TAE 1X e volume do produto aplicado em cada poço de 3µl. Voltagem 100V por 30 minutos.

A banda respectiva ao vetor *pCI-neo* de aproximadamente 6 kb, e a do gene L2wt com aproximadamente 1400 pb e o gene L2(11-200) 647 pb foram visualizadas. Além disso, as construções foram confirmadas por sequenciamento utilizando-se os *primers forward* e *reverse* que se anelaram ao vetor pCI-neo e após analisadas pelo editor e alinhador de sequências – *BioEdit*.

5.3 ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO DOS GENES L2 E E5

Para avaliar a funcionalidade das construções obtidas e consequente transcrição e presença do RNA mensageiro, após transfecção de 72 horas, o RNA total foi extraído de células HEK 293 previamente transfectadas. Cada amostra extraída continha uma construção respectiva, já citada anteriormente. Além disso, um controle negativo de células Hek 293 sem transfecção foi utilizado. As amostras transfectadas com as construções *pCIL2^{wt}* e *pCIL2¹¹⁻²⁰⁰* foram submetidas a RT-PCR com *primers* específicos para anelamento a região conservada de L2 referente aos aminoácidos 11 a 200. Os controles negativos não apresentaram nenhuma

amplificação, e, somente observou-se a formação das bandas esperadas de 647 pares de bases nos poços 3 a 6, como visto na figura 19.

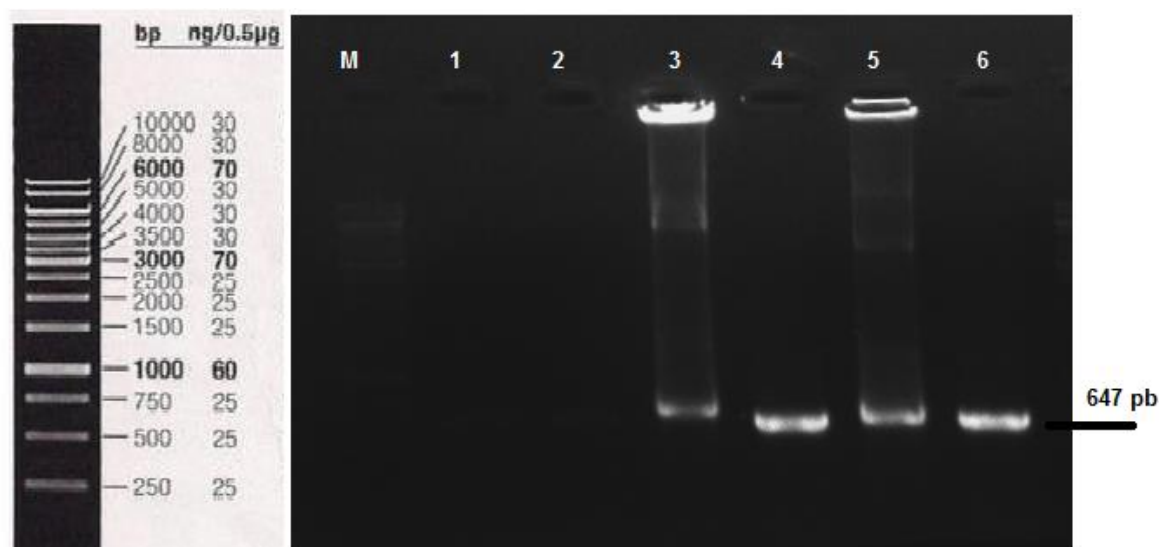


Figura 19: RT-PCR para análise da transcrição dos genes L2wt e L2 11-200. **M.** Marcador de corrida de 1Kb - (ThermoScientific). **1.** Controle negativo de PCR. **2.** Controle negativo de transfecção – Hek 293 não transfectadas. **3.** Controle positivo (L2^{wt}) **4.** Amostra transfectada com construção pCIL2^{wt}. **5.** Controle positivo (L2). **6.** Amostra transfectada com a construção pCIL2¹¹⁻²⁰⁰. Todas as amostras foram submetidas a RT-PCR utilizando *primers Forward* e *Reverse* para região conservada de L2¹¹⁻²⁰⁰. Eletroforese em gel de agarose 1%, em TAE 1X e volume do produto aplicado em cada poço de 5µl. Voltagem 100V por 30 minutos.

Após extração do RNA total, amostras transfectadas com as construções pCIE5^{wt}, pCIE5^{oti} foram submetidas a RT-PCR com *primers* específicos para anelamento nos genes E5^{wt} e E5^{oti}. As bandas respectivas para o genes E5 foram visualizadas somente no poço 3, da figura 20, referente ao controle positivo de E5^{wt}, apontam que o gene E5^{wt} possivelmente não encontrava-se transcrito pela maquinaria da célula HEK 293, na respectiva amostra. Os controles negativos para reação de PCR referente ao gene E5 selvagem não apresentaram nenhuma amplificação, evidenciando que não houve contaminação na etapa de preparação da PCR. No entanto, no poço 6, respectivo ao controle de transfecção (somente células 293), foi observado uma banda semelhante ao gene E5 sintético. A respectiva banda indica uma fraca contaminação de DNA, possivelmente na etapa de PCR, uma vez que a amostra controle HEK

não apresentou contaminação por DNA até a etapa de extração do RNA, como visto na figura 21.

Todavia, o poço 8 referente a amostra de célula 293 transfectada com a construção *pCIE5^{oti}* demonstrou atividade de transcrição do respectivo gene, pela maquinaria da célula.

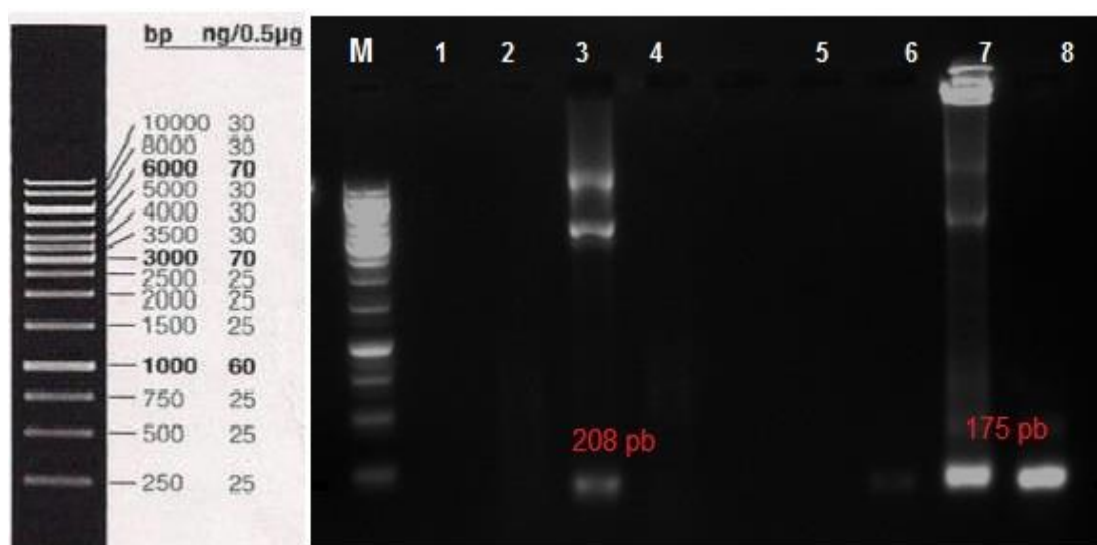


Figura 20: RT-PCR para análise da transcrição dos genes *E5wt* e *E5oti*. **M.** Marcador de corrida de 1Kb - (ThermoScientific). **1.** Controle negativo de PCR. **2.** Controle negativo de transfecção – Hek 293 não transfectadas. **3.** Controle positivo (*E5^{wt}*) **4.** Amostra transfectada com construção *pCIE5^{wt}*. **5.** Controle negativo de PCR. **6.** Controle negativo de transfecção – Hek 293 não transfectadas. **7.** Amostra transfectada com a construção *pCIE5^{oti}*. Todas as amostras foram submetidas a RT-PCR utilizando *primers Forward* e *Reverse* específicos para cada gene. Eletroforese em gel de agarose 1%, em TAE 1X e volume do produto aplicado em cada poço de 5µl. Voltagem 100V por 30 minutos.

Desse modo, dois controles negativos para reação de transcriptase reversa foram utilizados (amostra controle negativa Hek-293 e *E5^{wt}*, sem transcriptase). A *RT-PCR* com resultado negativo descartou a possibilidade de contaminação das amostras de RNA total com DNA (Figura 21). Portanto, a amplificação dos fragmentos esperados revela um indicativo da transcrição desses genes nas amostras transfectadas em que se obtiveram as bandas esperadas.

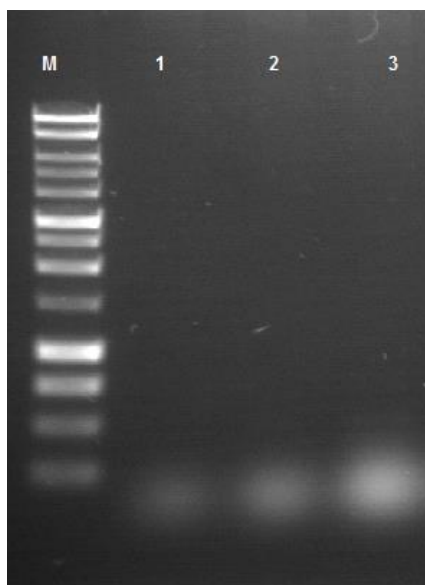


Figura 21: PCR das amostras evidenciando não contaminação com DNA. Reação controle negativo Hek-293 e E5^{wt}, sem adição da enzima transcriptase. **M**- marcador molecular 100 pb; **1**. Controle negativo da reação de PCR; **2**. Controle negativo da transfecção em Hek-293. **3**. Amostra transfectada com E5^{wt}.

5.4 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS E QUANTIFICAÇÃO POR BRADFORD

Para a realização do SDS-PAGE, todo o extrato obtido a partir da lise de células 293 via lise mecânica (dados não mostrados) e lise por *passive lysis buffer* (tampão 1x) foi quantificado por método de Bradford (1976). Em seguida, as amostras purificadas utilizando-se o *Ni-NTA Spin kit* (Qiagen) também foram quantificadas para futura análise e comparação entre os extratos e o conteúdo purificado. A tabela 3 demonstra a concentração proteica obtida a partir de duas lises diferentes e, métodos diferentes de transfecção (transiente) de expressão rápida e (seletiva) com utilização do antibiótico G418, por 4 semanas para seleção de células transfectadas com plasmídeo contendo o gene com resistência ao antibiótico mencionado (dados não mostrados no texto). Somente as amostras dos extratos que contém a proteínas ligadas ao epítipo 6xHis foram purificados. A amostra contendo a oncoproteína E5^{oti} não possui o epítipo 6xHis, portanto, não foi purificada, somente quantificado. As linhas horizontais de cores verdes identificam os extratos totais quantificados, em azul os controles negativo e positivo, as linhas cinza representam o primeiro precipitado recuperado após

passagem pela coluna de níquel, portanto, todas as proteínas que não se aderiram à resina. As linhas rosa são da primeira lavagem, seguida da 1° eluição das proteínas purificadas. As colunas representam a absorbância e concentração das proteínas referidas. A dosagem das proteínas foi realizada a partir de 20µl de amostra diluídos em 2 mL de solução de Bradford, (1976), e a medida de concentração foi avaliada em função da absorbância por análise de espectrometria, e seus valores gerados a partir da curva padrão de BSA.

Tabela 3: Quantificação por Bradford.

Amostras Quantificadas	Concentração µg/mL
Ext. Total pCIE5 otimizado	0,74
Ext. Total pCIE5 Wt	0,54
Ext. Total pCIL2 ¹¹⁻²⁰⁰	0,81
Ext. Total pCIL2 Wt	0,46
Ext. Controle Negativo	1,31
Ext. Controle Positivo	1,17
Amostra Purificada	
E5Wt Passive Lysis Buffer e Expressão Transiente	0,28
L2 ¹¹⁻²⁰⁰ Passive LysisBuffer e Expressão Transiente	0,27
L2wt Passive Lysis Buffer e Expressão Transiente	0,17
L2 ¹¹⁻²⁰⁰ Lise mecânica e Expressão Estável	0,28
1º Lavagem	
E5Wt Passive Lysis Buffer e Expressão Transiente	0,23
L2 ¹¹⁻²⁰⁰ Passive Lysis Buffer e Expressão Transiente	0,53
L2wt Passive Lysis Buffer e Expressão Transiente	0,27
L2 ¹¹⁻²⁰⁰ Lise mecânica e Expressão Estável	0,29
Eluído	
E5Wt Passive Lysis Buffer e Expressão Transiente	0,20
L2 ¹¹⁻²⁰⁰ Passive Lysis Buffer e Expressão Transiente	0,10
L2wt Passive Lysis Buffer e Expressão Transiente	0,12
L2 ¹¹⁻²⁰⁰ Lise mecânica e Expressão Estável	0,30

5.4 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS L2 E E5

Para realizar a confirmação da atividade das construções, culturas de células de mamíferos HEK-293 foram crescidas e transfectadas com as construções elaboradas. Os lisados celulares contendo os genes E5 foram observados a partir da eletroforese em gel de

SDS-PAGE 15% e para lisados celulares contendo L2 o SDS-PAGE a 12% foi utilizado, com a finalidade de apresentar as bandas relacionada às proteínas E5wt (15,8 kDa), E5 sintético (10 kDa), L2wt (74kDa) e L2⁽¹¹⁻²⁰⁰⁾ (51,6 kDa), para demonstrar a produção proteica da célula e posteriormente transferência para membrana PVDF e realização do *Western-blot*. No entanto, nenhum dos ensaios de *immunoblotting* foi capaz de detectar a produção das proteínas estudadas, tendo apenas em alguns dos ensaios o controle positivo sido detectado. Assim, como a análise das proteínas purificadas não obteve uma coloração adequada, ficando evidente o rendimento insatisfatório da purificação. Entretanto, um gel de poliacrilamida a 20% foi corrido com o intuito de apresentar as diferentes lises realizadas neste trabalho, bem como demonstrar as expressões transientes (figura 22A) e estáveis (figura 22B) utilizando as amostras pCIE5^{wt} e pCIL2¹¹⁻²⁰⁰.

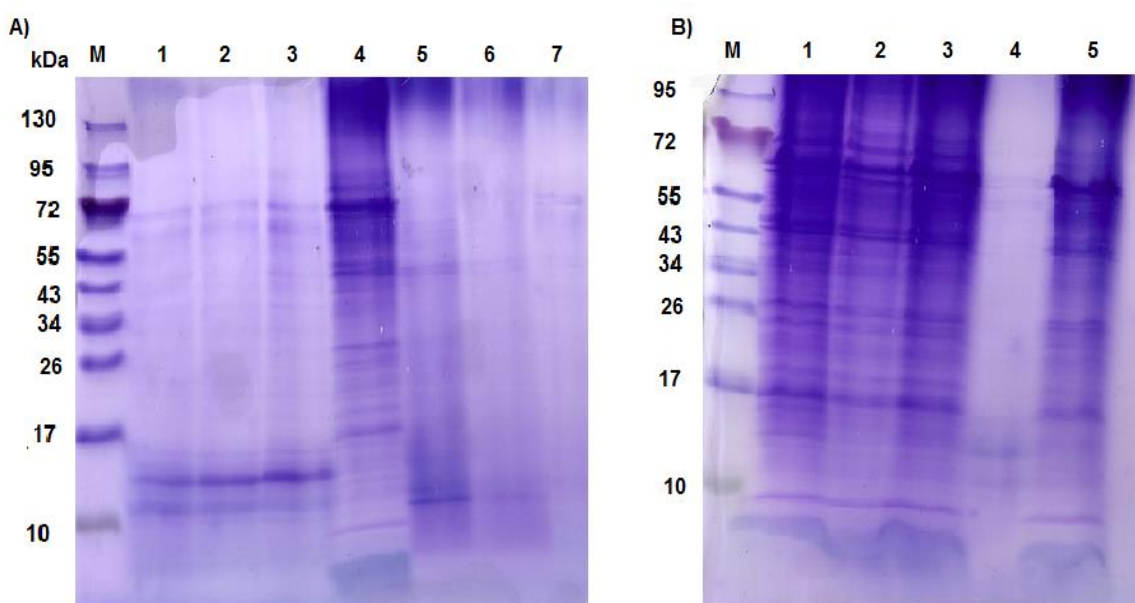


Figura 22: SDS – PAGE. **A)** Gel de Poliacrilamida à 20% da 1ª Lise com *Passive Lysis Buffer*, corado com *Coomassie*, dos extratos proteicos das células HEK – 293. **M.** marcador de peso molecular PageRuler™ (ThermoScientific). **1.** pCIE5 diluição 1:1; **2.** pCIE5 diluição 1:2; **3.** pCIL2 diluição 1:1; **4.** pCIL2 diluição 1:2; (Poço invertido com o segundo gel); **5.** pCIE5 a partir do *pellet*; **6.** pCIL2 a partir do *pellet*; **7.** Controle negativo pCI-vazio diluição 1:1; **B)** 2º Gel de Poliacrilamida à 20% da Lise Mecânica, corado com *Coomassie*, dos extratos proteicos das células HEK – 293. **M.** Marcador de peso molecular PageRuler™ (ThermoScientific). **1.** pCIE5 diluição 1:1; **2.** pCIE5 diluição 1:2; **3.** pCIL2 diluição 1:1; **4.** pCIE5 diluição 1:2 (Poço invertido com primeiro gel); **5.** Controle negativo pCI-vazio diluição 1:1.

6 DISCUSSÃO

A papilomatose bovina é uma doença infectocontagiosa causada pelos BPVs, esta família de vírus oncogênico (Borzacchiello, 2007) que pode induzir a formação de lesões na pele ou na mucosa dos animais infectados, e, ocasionalmente, desencadeia doenças importantes de aspecto veterinário, como a papilomatose bovina e o câncer (Borzacchiello e Roperto, 2008). Essas doenças representam um grave problema econômico para a agropecuária, uma vez que levam a deterioração do couro, perda de função reprodutiva e a desvalorização do animal (Lima et al., 2014). Além disso, estudos com papilomavírus animais servem como modelo para desenvolvimento de vacinas antivirais contra infecções pelo HPV, sendo ainda responsáveis por parte do conhecimento sobre resposta humoral e celular contra o vírus (Campo, 2002). Portanto, o desenvolvimento de estratégias vacinais profiláticas e terapêuticas é muito aguardado, e de grande interesse veterinário e econômico.

Inicialmente, os genes $L2^{wt}$ e $L2^{11-200}$ foram amplificados a partir do genoma viral completo de BPV-2 via PCR, gerando fragmentos de 1400 pb e 647 pb. Após a clonagem dos genes em vetor pGEM-T easy, que foram sequenciados e digeridos confirmando a clonagem dos mesmo. As mesmas construções foram digeridas com as respectivas enzimas, assim como o vetor pCI-neo e posteriormente ligados. A boa concentração de DNA facilitou a etapa de ligação no vetor pCI-neo, que foi realizada sem a necessidade de repetição do experimento. Depois de identificados os possíveis clones ($pCIL2^{wt}$, $pCIL2^{11-200}$, $pCIE5^{wt}$ e $pCIE5^{oti}$) as colônias foram submetidas à digestão e novamente o sequenciamento foi realizado, confirmando que as sequências gênicas corretas foram subclonadas.

No presente trabalho, o vetor para expressão em células de mamífero, pCI-neo, foi o escolhido para a realização da subclonagem e posterior transfecção em células da linhagem HEK-293. O vetor pCI-neo pode ser utilizado tanto para expressões transientes, como também para a expressão estável utilizando-se antibiótico neomicina (G418) para seleção das

células transfectadas. Isso acontece, pois, este vetor possui o gene da neomicina fosfotransferase capaz de inativar G418 e seus efeitos tóxicos (Promega USA, 2009).

Outro fator importante, é o sítio intrônico contido no vetor pCI-neo ao qual alguns estudos tem demonstrado acentuar os níveis de transcrição. Um trabalho realizado por Huang e Gorman (1990), comparou dois vetores que se diferenciavam apenas na ausência ou presença de uma sequência interveniente (*IVS-intervening sequence*), onde os níveis da proteína sinal foram aumentados cerca de (6 – 50 vezes). Além disso, foi demonstrado que as concentrações de mRNA e da proteína resultantes em células HEK 293 e HeLa foram proporcionais. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, visto que a análise do cDNA via transcriptase reversa detectou a presença do RNA mensageiro dos genes de $L2^{wt}$, $L2^{11-200}$ e $E5^{oti}$, no entanto, não foi possível a imunodeteção dessas proteínas. Sendo o epítipo de $L2^{11-200}$ clonado pela primeira vez no grupo, e, portanto pela primeira vez avaliada a sua expressão.

Desta forma, duas formas de seleção foram utilizadas inicialmente, a seleção estável e a seleção transiente. Essa última forma de seleção se mostrou mais adequada, visto que após seleção de 4 semanas os extratos celulares se mostraram demasiado viscosos dificultando a lise celular e até mesmo aplicação dessas amostras no gel SDS-PAGE. Além disso, outros trabalhos do grupo já demonstraram a produção de proteínas utilizando a expressão transiente, ou seja, sem o uso de antibiótico para a seleção celular, como em Lima (2011) e que evidenciou a produção de L2 de BPV-1 sem a necessidade de códon-otimização.

Inicialmente, esperava-se avaliar a funcionalidade das construções, objetivo esse que foi atingido via análise da transcrição do RNA. No entanto, também se pretendia escolher o método que possibilitasse a produção e purificação dessas proteínas para futuros experimentos de imunizações em camundongos, e assim auxiliar em estudos comparativos entre as formas peptídicas e a vacina de DNA. Já que células de mamíferos tem se tornado um dos principais

sistemas de produção de proteínas pela sua capacidade de fornecer modificações pós-traducionais quando comparado a outros sistemas (Wurm, 2004).

No entanto, o método de expressão seletiva tornava o extrato celular mais viscoso, mostrando-se inadequado. Por esse motivo, optou-se pelo método transiente de expressão em células de mamífero que apresentou um extrato celular menos viscoso e mais fácil de trabalhar.

Além disso, outro aspecto avaliado foi a transfecção baseada em lipídeos catiônicos, pois esses apresentam relativa toxicidade que pode variar de acordo com o tipo de células. Esses complexos químicos carregam positivamente o DNA de interesse que é atraído para a membrana celular carregada negativamente. No entanto, o excesso dessas cargas pode desestabilizar as membranas celulares, tornando assim o complexo citotóxico (Kim e Eberwine, 2010). Portanto, para essa etapa foi necessária adequação do protocolo sugerido pelo fabricante, uma vez que a etapa de incubação das células com o complexo DNA/lipossomo, foi diminuída para 4 horas seguido de adição de 5mL de meio DMEN novo, dessa forma diminuindo o tempo de exposição das células a possíveis efeitos citotóxicos.

Em contrapartida, visando à detecção das proteínas de interesse, duas formas de lise proteicas foram efetuadas. A primeira lise foi realizada depois de um período de 4 semanas de seleção com seleção baseada no uso do antibiótico G418. Para o primeiro tipo de lise foi escolhido o tampão *Passive Lysis buffer* (Promega), entretanto, após a realização do *immunoblotting* as proteínas de estudo não foram detectadas. Além disso, observou-se grande dificuldade em aplicar os lisados celulares nos poços para corrida em géis de poliacrilamida, pela viscosidade dos mesmos.

Dessa forma, com o intuito de solucionar uma possível falha do tampão utilizado para a primeira lise, uma segunda estratégia de lise foi realizada. A segunda lise foi por via mecânica, utilizando seringas de insulina, como realizado em trabalhos prévios do grupo

(Lira, 2010) e (Lima, 2011). Novamente, as amostras se mostraram viscosas e de difícil aplicação no gel SDS-PAGE, e consequentemente após transferência e realização do *Western Blot* as proteínas de interesse não foram detectadas. Assim, depois de ensaios observou-se que a expressão transiente seguida de lise por tampão (*Passive Lysis Buffer*, Promega) se mostrou mais adequada.

No entanto, é sabido que a etapa de imunoprecipitação, e a solubilização de proteínas de membrana, como no caso de E5 se faz necessário para seu desligamento das membranas celulares (Edwards *et al*, 2013). Dessa forma, facilitando posteriormente o seu reconhecimento aos anticorpos, e, sendo em alguns estudos realizados duas etapas de imunoprecipitação (O'Brien *et al*, 2001). Entretanto, outra questão importante do trabalho é a quantidade de proteína E5 necessária para detecção via Western blot. Haja vista que em trabalhos como Suprynowicz *et al*, (2005), Lira (2010) e Coimbra (2012) a detecção dessa proteína só foi possível após etapa de imunoprecipitação, o que torna o estudo com a oncoproteína E5 dispendioso e custoso, uma vez que se necessita de demasiada quantidade de anticorpo. Além disso, outro aspecto relevante seria o fato de que as células transfectadas com as respectivas construções, não apresentarem uma expressão tão eficiente das proteínas. Apesar disso, as células escolhidas para trabalho HEK 293 são linhagem celulares predominantemente usadas para expressão transiente de proteínas recombinantes (Petiot *et al*, 2015) além de terem sido utilizadas como sistema de expressão em outros trabalhos do grupo. Ademais, o uso de um promotor forte como CMV, que interage com diferentes fatores de transcrição garantem um nível de expressão em células de mamíferos (Soares, 2011).

Para refinar os dados apresentados, as amostras obtidas foram purificadas utilizando-se o *Ni-NTA Spin kit* (Qiagen) e seguidas de quantificação por Bradford (1976). A tabela 3 aponta as concentrações obtidas dos precipitados recolhidos durante processo de purificação

em coluna de níquel, e como mostrado na tabela sugerindo que não houve uma ligação eficiente das proteínas fusionadas a His-tag com a resina.

Em outro aspecto, problemas de rendimento na purificação de proteínas conjugadas a cauda-histidina podem ser o resultado de uma não conformação adequada. Além disso, em recentes trabalhos do grupo, de maneira semelhante, os ensaios utilizando o anticorpo anti-His não obteve sucesso em demonstrar a presença da proteína L1 em amostras obtidas a partir do extrato total, assim como em amostras provenientes de purificação. Todavia, essa identificação só foi possível mediante emprego do anticorpo anti-L1 (CamVir®) (Mariz, 2012).

O presente estudo, portanto, conseguiu detectar a presença dos transcritos de 3 construções utilizadas. A não detecção do transcrito do gene E5 selvagem não necessariamente indica que esse não esteja sendo expresso, uma vez que em outros experimentos o mesmo já foi detectado. Além disso, em outros estudos o gene E5 selvagem foi detectado como em Sparkowski *et al*, (1994) e Gruener *et al*, (2007). No entanto, pela primeira vez o gene E5 selvagem de BPV-2 foi clonado no grupo, possibilitando que a expressão desse gene possa ser testada em outros sistemas de expressão, para que a proteína seja recuperada, purificada e utilizada para outros experimentos. Portanto, a comparação das construções em outros sistemas de expressão pode ser válida, como *E. coli* bem como, em outras linhagens celulares de mamíferos. Embora, as proteínas não tenham sido detectadas, métodos alternativos de lise celular e, protocolos de precipitação de proteínas e solubilização poderão futuramente ser empregados.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho, os resultados obtidos caracterizam a funcionalidade em nível de transcrição das construções pCIL2^{Wt}, pCIL2¹¹⁻²⁰⁰ e pCIE5^{otimizado}. Sugerindo que as construções tenham potencial considerável de gerar proteínas em células de mamíferos. Assim futuramente, as construções poderão vir a ser testadas *in vivo*, o que poderá comprovar os seus efeitos terapêuticos (regressão tumoral) ou profilático (geração de resposta humoral). Portanto, essas informações são de extrema importância para futuros experimentos e estratégias vacinais que venham a ser desenvolvidas pelo grupo.

Para o estabelecimento da produção proteica, adequações serão necessárias visto que as mesmas construções não foram capazes de gerar as proteínas de interesse, ou não foram detectadas pelos protocolos utilizados, mesmo após modificações. Desse modo, estratégias de cultivo, seleção, lise celular, purificação e outras formas de recuperação da proteína deverão ser exploradas no futuro, de modo que evite maiores gastos de tempo e recursos financeiros.

REFERÊNCIAS

- Antonsson A, McMillan, N.A.J. (2006) Papillomavirus in Healthy skin of Australian Animals. *Journal of General Virology*. 87. 3195-3200.
- Araldi RP, Melo TC, Neves AC, Spadacci-Morena DD, Magnelli RF, Modolo DG, De-Sá-Júnior PL, Mazucchelli-de-Souza J, Carvalho RF Beçak W e Stocco RC (2015). Hyperproliferative action of bovine papillomavirus: genetic and histopathological aspects. *Genet. Mol. Res.* 14 (4): 12942-12954. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.October.21.15>.
- Batista MVA (2013). Uso de novas ferramentas computacionais no estudo da diversidade genética de papilomavírus bovino associado à epidemiologia molecular da papilomatose bovina cutânea. 120 p. (Dissertação) Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco-Recife.
- Bergman PJ e Wolchok JD (2008). Of Mice and Men (and Dogs): development of a xenogeneic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma. *Cancer Therapy* Vol 6, 817-826.
- Bernard HU (2005) The Clinical Importance of the Nomenclature, Evolution and Taxonomy of Human Papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*. 32S. S1–S6.
- Bon AL. Tough DF (2002). Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Current Opinion in Immunology*, 14:432–436.
- Borzacchiello G, Russo V, Gentile F, Roperto F, Venuti A, Nitsch L, Campo MS, Roperto S. (2006). Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor b receptor in naturally occurring bovine
- Borzacchiello G. Roperto F (2008). *Bovine papillomaviruses*, papillomas and cancer in cattle. *Vet. Res.* 39:45.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v-72. p- 248-254.
- Brasil (2015). Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República Ministro. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – Ipea.
- Buck CB, Thompson CD, Pang YS, Lowy DR e Schiller JT (2005). Maturation of Papillomavirus Capsids. *J Virol* 79:2839-2846.
- Campo MS (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Research* 89. 249-261.
- Campo M, S., Roden, R, B, S. (2010). Papillomavirus Prophylactic Vaccines: Established Successes, New Approaches. *Journal of Virology*. 84. 1214-1220.
- Campo MS (1997). Vaccination against papillomavirus in cattle. *Clin Dermatol* 15:75-283.
- Campo MS.; Jarrett, WFH. O'neil, BW. Barron, RJ (1994). Latent papillomavirus infection in cattle. *Research in Veterinary Science*, v. 56, p. 151-157.
- Carvalho CCR. Batista MVA. Silva MAR. Balbino VQ. Freitas1 AC (2013). Detection of Bovine Papillomavirus Types, Co-Infection and a Putative New BPV11 Subtype in Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*. doi:10.1111/j.1865-1682.2011.01296.x
- Chen YF, Lin CW, Tsao YP, Chen SL (2004). Cytotoxic-T-Lymphocyte Human Papillomavirus Type 16 E5 Peptide with CpG-Oligodeoxynucleotide Can Eliminate Tumor Growth in C57BL/6 Mice. *Journal of virology*. 1333–1343.
- Claus MP. Lunardi M. Alfieri AF. Ferracin LM. Fungaro MHP. Alfieri AA (2008). Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. *Veterinary Microbiology* 132: 396–401.

- Corteggio A, Altamura G, Roperto F, Borzacchiello G (2013). Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one?. *Infect Agent Cancer*. 8: 1.
- Da Silva DM, Eiben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, Rudolf MP, Velders MP e Kast WM. (2001). Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J. Cell Physiol*. 186:169-182.
- Davidson, A. H. Traub-Dargatz J L, Rodeheaver R M, Ostlund E N, Pedersen D D, Moorhead R G, Stricklin J B, Dewell R D, Roach S D, Long R E, Albers S J, Callan R J, Salman M D. (2005). Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 226, 240–245.
- DiMaio D, Petti L (2013). The E5 Proteins. *Virology*. 445(0): 99–114.
- DiMaio D, Mattoon D (2001). Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*. (54) 7866-73.
- Doobar J. (2005) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci*. 110: 525–541.
- Edwards AP, Xie Y, Bowers L, DiMaio D (2013). Compensatory mutants of the bovine papillomavirus E5 protein and the platelet-derived growth factor β receptor reveal a complex direct transmembrane interaction. *J Virol*. 87(20):10936-45.
- Ferraro B, Morrow M P, Hutnick N A, Shin T H, Lucke C E e Weiner D B (2011). Clinical Applications of DNA Vaccines: Current Progress. *Clinical Infectious Diseases* 53(3):296–302.
- Frazer, I (2007). Correlating immunity with protection for HPV infection.. *International Journal of Infectious Diseases* S10-S16.
- Freeman-Cook LL, DiMaio D (2005). Modulation of cell function by small transmembrane proteins modeled on the bovine papillomavirus E5 protein. *Oncogene* 24, 7756–7762.
- Garcea RL. Chen X (2007). Papillomavirus Structure and Assembly. 69-88.
- Garver K A, LaPatra S E e Kurath G (2005). Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon. *Dis Aquat Org*. Vol. 64: 13–22.
- Gruener M, Bravo IG, Momburg F, Alonso A e Tomakidi P (2007). The E5 protein of the human papillomavirus type 16 down-regulates HLA-I surface expression in calnexin-expressing but not in calnexin-deficient cells. *Virology Journal*. 4:116.
- Hagensee, M. E. Olson, N. H. Baker, T. S. Galloway, D. A (1994). Three-Dimensional Structure of Vaccinia Virus-Produced Human Papillomavirus Type 1 Capsids. *Journal of virology*, p. 4503-4505.
- Huang, MTF e Gorman, CM (1989). Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. 18, No. 4
- Karanam B. Jagu S. Huh WK. Roden RBS (2009). Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunol Cell Biol*. 87(4): 287–299.
- Kim TK e Eberwine JH (2010). Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem*. 397(8): 3173–3178.
- Kirnbauer R. Chandrachud LM. O'neil BW. Wagner ER. Grindlay GJ. Armstrong A. MCGARVIE GM. Schiller JT. Lowy DR. CAMPO MS (1996). Virus-like Particles of Bovine Papillomavirus Type 4 in Prophylactic and Therapeutic Immunization. *Virology* 219, 37–44.
- Kutzler M A e Weiner D B (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews – Genetics*. Volume 9.
- Leptak C, Cajal SR, Kulke R, Horwitz BH, Riese II RJ, Dotto GP, Dimaio D (1991). Tumorigenic Transformation of Murine Keratinocytes by the E5 Genes of Bovine

- Papillomavirus Type 16 and Human Papillomavirus Type 16. *Journal of virology*. 7078-7083.
- Li L, Guo Y, Li Z, Zhou Y, Zeng Y (2016). Protein transduction domain can enhance the humoral immunity and cross-protection of HPV16L2 peptide vaccines. *BIOMEDICAL R 746 EPORTS* 4: 746-750.
- Liang K W, Hoffman E P e Huang L (2000). Targeted Delivery of Plasmid DNA to Myogenic Cells via Transferrin-Conjugated Peptide Nucleic Acid. *Molecular Therapy*. Vol. 1. N°. 3. doi:10.1006/mthe.2000.0043.
- Lima EG, Lira RC, Jesus ALS, Dhalia R, Freitas AC (2014). *Genet. Mol. Res.* 13 (1): 1121-1126.
- Liu WJ, Gissmann L, Sun, XY, Kanjanahaluethai A, Muller M, Doorbar J, Zhou, J. Sequence close to the N-terminus of L2 protein is displayed on the surface of bovine papillomavirus type 1 virions. *Virology*, v. 227, p. 474-483, 1997.
- Lowy, D. R. Schiller, J. T (2006). Prophylactic human papillomavirus vaccines. *The Journal of Clinical Investigation*. Vol. 116. (5).
- MacGregor R R, Boyer J D, Ugen K E, Lacy K E, Gluckman S J, Bagarazzi M L, Chattergoon M A, Baine Y, Higgins T J, Ciccarelli R B, Coney L R, Ginsberg R S e Weiner D B. (1998). First Human Trial of a DNA-Based Vaccine for Treatment of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Safety and Host Response. *The Journal of Infectious Diseases* 178:92-100.
- Mariani, L. Venuti, A (2010). HPV vaccine: an overview of immune response, clinical protection, and new approaches for the future. *Journal of Translational Medicine*. 8: 105.
- Mariz FC (2012). Expressão do gene l1 de hpv-16 em pichia pastoris empregando promotor induzível paox1 e promotor constitutivo ppgk1 visando desenvolvimento de um sistema para produção vacinal. 110 p. (Dissertação) Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco - PE
- McGarvie GM, Grindlay GJ, Chandrachud LM, O'Neil BW, Jarrett WF, Campo MS (1995). T cell responses to BPV-4 E7 during infection and mapping of T cell epitopes. *Virology*. 206 (1):504-10.
- Molina AA, Hernández-Valencia, JF, Lamoyi, E, Contreras-Paredes A, Lizano M (2013). Role of Innate Immunity against Human Papillomavirus (HPV) Infections and Effect of Adjuvants in Promoting Specific Immune Response. *Viruses*, 5, 2624-2642; doi:10.3390/v5112624.
- Monteiro VLC, Coelho MCOC, Carneiro AS, Silva RAA, Teixeira MN, Wanderley AG, Wanderley EK, Franco ES (2008). Descrição clínica e histopatológica da papilomatose cutânea bovina (BPV). *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 4, p. 1079-1088.
- Munday JS (2014). Bovine and Human Papillomaviruses: A Comparative Review. *Veterinary Pathology* Vol. 51(6) 1063-1075.
- Munday JS (2014). Bovine and Human Papillomaviruses: A Comparative Review. *Veterinary Pathology*. Vol. 51(6) 1063-1075.
- Nasir L e Campo MS (2008). Papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Vet Dermatol*. 19(5):243-54.
- O'Brien V, Grindlay GJ e Campos MS (2001). Cell transformation by the e5/e8 protein of bovine papillomavirus type 4 p27^{kip1}, elevated through increased protein synthesis, is sequestered by cyclin d1-cdk4 complexes
- OCDE-FAO Perspectivas Agrícolas 2015-2024. Capítulo 2. Agricultura brasileira: *Perspectivas e Desafios*.
- Peakman M, Vergani D (1999). *Imunologia Básica e Clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan.

- Pereira R Hitzeroth II, Rybicki EP (2009). Insights into the role and function of L2, the minor capsid protein of papillomaviruses. *Arch Virol.* 154:187–197.
- Petiot E, Cuperlovic-Culf M, Shen CF e Kamen A (2015). Influence of HEK293 metabolism on the production of viral vectors and vaccine. *Vaccine.* 4;33(44):5974-81
- Rector, A. Ranst, R. V. Animal papillomaviruses (2013). *Virology* 445. 213–223.
- Rippe RA, Meinke WJ (1989). Identification and Characterization of the BPV-2 L2 Protein. *Virology* 171.298-301.
- Roden RBS, Greenstone HL, Kirnbauer R, Booy FP, Jessie J, Lowy DR, Schiller JT (1996). In Vitro Generation and Type-Specific Neutralization of a Human Papillomavirus Type 16 Virion Pseudotype. *Journal of virology.* 5875–5883.
- Roldão A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. (2010). Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 9(10):1149-76.
- Roperto S, Russo V, Ozkul A, Corteggio A, Sepice-Dincel Aylin, Catoi C, Esposito I, Riccardi MG, Urraro C, Lucá R, Ceccarelli Dora M, Longo M, Roperto F (2013). Productive Infection of Bovine Papillomavirus Type 2 in the Urothelial Cells of Naturally Occurring Urinary Bladder Tumors in Cattle and Water Buffaloes. *PLOS ONE.* Volume 8:5
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 800 p.
- Santos EUD, Silva MAR, Pontes NE, Coutinho LCA, Paiva SSL, Castro RS, Freitas AC (2013). Detection of Different Bovine Papillomavirus Types and Co-infection in Bloodstream of Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases.* doi:10.1111/tbed.12237.
- Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A, Supryniewicz F, Schlegel R, Grinstein S (2000). Golgi Alkalinization by the Papillomavirus E5 Oncoprotein. *The Journal of Cell Biology,* Volume 148, 305–315.
- Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A and zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985; 314: 111-114.
- Soares, RBS (2011). Construção e caracterização de vetor adenoviral com promotor responsivo ao seu próprio transgene p53 e sua comparação com um vetor de promoção constitutiva. 77 p. (Tese) Doutorado. Universidade de São Paulo – SP.
- Southern, S, A., Henrrington, C, S. (1998). Molecular events in uterine cervical câncer. *Sex Transm Inf.* 74.101-109.
- Spada, JCP, Martins, AA, Sanches, SR, Leite, ER, Spada, FP, Rial, ALS (2013). Auto-hemoterapia Papilomatose bovina – Relato de Caso. *Ciên. Agr. Saúde. FEA.* Andradina, V.9, 78-81.
- Sparkowski J, Anders J, Schlegel R. (1994). Mutation of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein at amino acid 17 generates both high- and low-transforming variants. *J Vir.* 68(9):6120-3.
- Supryniewicz FA, Disbrow GL, Simic V, Schlegel R (2005). Are transforming properties of the bovine papillomavirus E5 protein shared by E5 from high-risk human papillomavirus type 16? *Virology.*332:102–113.
- Stanley M (2005). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine.* Mar 30;24 Suppl 1:S16-22.
- Tang DC, DeVit M, Johnston S A (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 356:152–154.
- Tessele B, Barros CSL (2016). Tumores em bovinos encontrados em abatedouros frigoríficos. *Pesq. Vet. Bras.* 36 (3) 145-160. DOI: 10.1590/S0100-736X2016000300002.
- Thacker, E L, Holtkamp D J, Khan A S, Brown P A e Draghia-Akli R (2006). Plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone efficacy in reducing disease associated

- with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Anim. Sci.* 84, 733–742. tumour tissue and efficacy of treatment using autogenous vaccine and parammunity inducer. *Veterinarski arhiv* 75 (5), 391-397.
- Turk, N. Župančić, Z. Starešina, V. Kovač, S. Babić, T. Kreszinger, M. Ćurić, S. Barbić, L. Milas, Z (2005). Severe bovine papillomatosis: detection of bovine papillomavirus in
- Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S E, Rhodes G H, Feigner P L, Dwarki V J, Gromkowski S H, Deck R R, DeWitt C M, Friedman A, Hawe L A, Leander K R, Martinez D, Perry H C, Shiver J W, Montgomery D L, Liut M A (1993). Heterologous Protection Against Influenza by Injection of DNA Encoding a Viral Protein. *Science*. vol. 259.
- Um SJ, Rhyu JW, Kim EJ, Jeon KC, Hwang ES, Park JS (2002). Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. *Cancer Letters* 179. 205–212. urinary bladder tumours *Oncogene*. 25, 1251–1260.
- USDA Foreign Agricultural Service (2014). Disponível em <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>>.
- Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS Borzacchiello G (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular Cancer*. 10: 140.
- Wang JH. Roden RBS (2013). L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology* 445. 175–186.
- Wolff JA, Malone R W, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A e Felgner PL. (1990). Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science*, vol. 247.
- Wurm FM (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 22(11):1393-8.
- Xu YF, Meyer AN, Webster MK, Lee BA, Donoghue DJ (1993). The v-sis protein retains biological activity as a type II membrane protein when anchored by various signal-anchor domains, including the hydrophobic domain of the bovine papilloma virus E5 oncoprotein. *J Cell Biol*. 123 (3) 549–560.
- Yang B, Yang A, Peng S, Pang X, Roden RBS. Wu TC. Hung CF (2015). Co-administration with DNA encoding papillomavirus capsid proteins enhances the antitumor effects generated by therapeutic HPV DNA vaccination. *Cell & Bioscience* 5:35.
- Yang L, Li R, Mohr IJ, Clark R e Botchan MR (1991). Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature*. 353(6345): 628-32.
- Yim EK. Park JS (2005). The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res Treat*. 37(6):319-324.
- Zimmermann H, Koh CH, Degenkolbe R, O'Connor MJ, Muller A, Steger G, Chen JJ, Lui Y, Androphy E and Bernard HU (2000) Interaction with CBP/p300 enables the bovine Imte2 papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J Gen Virol* 81:2617-2623.
- Zur Hausen H (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342-350.