

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

**Produção da proteína L1 do Papilomavírus
bovino tipo 1 em *Pichia pastoris***

André Luiz Santos de Jesus

Recife, PE
Agosto, 2008

André Luiz Santos de Jesus

**Produção da proteína L1 do Papilomavírus
bovino tipo 1 em *Pichia pastoris***

Dissertação apresentada ao Programa de **Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco**, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de **Mestre em Genética**.

Orientador: **Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas**, Depto. de Genética, Centro de Ciências Biológicas, UFPE.

**Recife, PE
Agosto, 2008**

Jesus, André Luiz Santos de
Produção da proteína L1 do Papilomavírus bovino tipo 1 em *Pichia pastoris*
André Luiz Santos de Jesus – Recife: O Autor, 2008

74 folhas: il., fig., tab.

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CCB. Departamento de Genética, 2009.**

Inclui bibliografia

1. Papilomavírus bovino. 2. *Pichia pastoris* (levedura). 3. Sistema de expressão heterólogo. 4. Proteína L1 | Título.

616-006.52

CDU (2.ed.)

UFPE

614.581

CDD (22.ed.)

CCB – 2009- 75

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

PARECER DA COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

André Luiz Santos de Jesus

“PRODUÇÃO DA PROTEÍNA L1 DO PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPO 1 EM
***Pichia pastoris*”**

Área de concentração: **BIOLOGIA MOLECULAR**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do
segundo, considera o candidato

ANDRÉ LUIZ SANTOS DE JESUS como **APROVADO**

Recife, 15 de Setembro 2008.


Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas (Genética - UFPE)


Membro Externo: Dr. Roberto Soares de Castro (Medicina Veterinária - UFRPE)


Membro Interno: Dr. Tercilio Calza Júnior (Genética - UFPE)


Membro Interno: Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior (Genética - UFPE)


Coordenador do Programa: Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior

**Dedico esta dissertação à meu
pai Luiz e minha mãe
Joselinda. Sem vocês nada faz
sentido!**

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado durante todos esses anos inteligência, saúde, e força de vontade para seguir em frente e ter a chance de alcançar meus objetivos.

A toda minha família, em especial, meus dois irmãos César e Gustavo, minha irmã Camilla, meu pai Luiz e minha mãe Joselinda, pelo apoio incondicional que sempre me foi dado. Não tenho palavras para agradecer nem ações que possam no mínimo chegar perto de retribuir tudo o que vocês fizeram e fazem por mim. Tenham certeza de que todo o meu esforço é para que vocês possam se orgulhar de mim. Essa conquista também é muita de vocês cinco!

A minhas primas Maiara e Maíra, minhas companheiras de moradia em Recife, que me deram muita força, me ajudando e me ensinando como sobreviver longe de casa, da família e dos amigos.

A meus professores da pós-graduação em Genética pelos ensinamentos e conhecimento passados a mim durante os dois anos do mestrado. Em especial, meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas, pela confiança depositada em mim quando me aceitou como seu aluno, mesmo sem me conhecer direito. Tenho uma dívida de gratidão muito grande com o professor e prometo me esforçar ao máximo para quem sabe um dia pagar essa dívida.

Aos meus novos e grandes amigos que tive a honra de ganhar aqui em Recife durante o mestrado, pelos momentos de distração que foram fundamentais para que pudesse sobreviver durante esse tempo. Não é nada fácil sair de sua casa, deixar sua família e amigos e ir morar em outro estado. E se eu consegui superar toda essa dificuldade é porque eu tive vocês meus amigos para me ajudarem. Vocês podem não saber (ou talvez eu não demonstre como deveria), mas vocês foram fundamentais para essa minha conquista!

Aos meus colegas de mestrado Isaac, Neto, Carlos e Esteban.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos (o glorioso LGM) Rochane, Rute, Billy, Brígida, Carla, Guila, Rodrigo, Felipe Alecrim e, em especial, Fernanda, a primeira pessoa que conheci no laboratório e que se transformou numa grande amiga, obrigado por tudo que você e sua família fizeram por mim!

Aos meus grandes colegas do Grupo Papilomavírus responsáveis por incessantes horas de pura ciência e outras coisas mais. Eliane e Júlia, minhas duas grandes amigas que muito aprendi, mas principalmente que muito ri. Maria Fernanda, Mirela e Renato, amigos que não estão mais próximos de nós, mas que onde estiverem terão sempre minha torcida para que sejam felizes. Angélica e Cybelle, minhas queridas colegas do mestrado com quem comecei no mundo dos papilomavírus. Rafaelle, Bárbara, Nayara, Élyda, Felipe, Carolina e Isadora, colegas que chegaram há pouco tempo, mas que já se tornaram grandes parceiros e que se permitem frisar certamente terão um grande futuro pela frente. E por fim, mas não menos importante, Filipe, Marcelo e Janaíne, meus fiéis estagiários os quais tentei ensinar tudo o que aprendi da melhor forma possível e que tenho certeza que com o potencial que possuem muito em breve vocês irão ultrapassar esse seu mestre - me orgulho muito de como vocês evoluíram e agora conseguem passar adiante o que aprenderam.

Um parágrafo especial para agradecer a uma dupla muito importante, Helder e Elaine. Meus grandes amigos com quem vivi grandes aventuras e que sempre terão minha incondicional admiração e ajuda para qualquer coisa que precisarem na vida.

Aos funcionários do Departamento de Genética da UFPE pela ajuda concedida, em especial, Romildo e Dona Zizi, duas pessoas batalhadoras, simples e sempre dispostas a ajudar, que tive a honra e o prazer de conviver.

A todos citados ou não, meus mais sinceros e profundos votos de gratidão pelo que fizeram por mim. Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	ii
Lista de Abreviações	iii
Resumo	1
Abstract	2
1. Introdução	3
2. Revisão bibliográfica	5
2.1. Papilomavírus	5
2.1.1. Papilomavírus Bovino (BPV)	6
2.2. Papilomatose Bovina	7
2.3. Genoma de BPV	11
2.4. Relação Parasito-Hospedeiro	15
2.4.1. Processo Carcinogênico	17
2.5. Resposta Imune ao Papilomavírus	20
2.6. Estratégias de Imunização	23
2.6.1. <i>Virus-Like Particles</i> (VLPs)	23
2.7. Sistemas Heterólogos de Expressão	26
2.8. <i>Pichia pastoris</i>	28
3. Referências Bibliográficas	37
4. Objetivos	50
5. Manuscrito de Artigo Científico	51
6. Conclusões	69
7. Informações Complementares	70
7.1. Vetor de Expressão pPICZA	70
8. Anexos	72
8.1. Instruções para autores – <i>Genetics and Molecular Biology</i>	72

LISTA DE FIGURAS

	Página
Revisão da Literatura	
Figura 1. Representação diagramática da carcinogênese em bexiga urinária	9
Figura 2. Representação linear do genoma de BPV 1	11
Figura 3. Ciclo de infecção do PV	17
Figura 4. Esquema da ação das oncoproteínas E6 e E7	19
Figura 5. Ilustração da estrutura do capsídeo viral	24
Figura 6. Ilustração da estrutura de uma VLP	25
 Manuscrito	
Figura 1. (A) Amplificação do gene L1 de BPV 1	59
(B) Construção pGEML1B1	59
(C) Construção pPICZAL1B1	59
Figura 2. PCR das colônias de <i>P. pastoris</i> X-33/pPICZAL1B1 usando os <i>primers</i> AOX1	60
Figura 3. RT-PCR dos Recombinantes X-33/pPICZAL1B1 após 96h de indução com metanol 2%	61
Figura 4. (A) Dot Blot usando anticorpo anti-L1 (CamVir1)	62
(B) Dot Blot usando anticorpo anti-His conjugado a fosfatase alcalina	62

LISTA DE TABELAS

	Página
Revisão da Literatura	
Tabela 1. Vantagens e desvantagens do uso de sistemas com o promotor AOX	30

LISTA DE ABREVIACES

AOX	Gene que codifica a álcool oxidase
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ARG4	Gene que codifica a arginosuccinato liase
Asn	Asparagina
BPV	Papilomavírus bovino
BMGY	<i>Buffered Glycerol-complex Medium</i>
BMMY	<i>Buffered Methanol-complex Medium</i>
COPV	Papilomavírus oral canino
CRPV	Papilomavírus do coelho <i>cottontail</i>
DCs	Células dendríticas
DNA	cido desoxirribonucléico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ou ácido etilenodiamino tetra-acético
FLD1	Gene que codifica a formaldeído desidrogenase glutatona-dependente
GAP	Gene que codifica a gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase
GI	Gastrointestinal
HPV	Papilomavírus humano
HIS4	Gene que codifica uma enzima multifuncional que catalisa o segundo, terceiro, nono e décimo passos na biossíntese de histidina
IgG	Imonuglobulina G
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LCR	Região longa de controle
MHC I	Complexo maior de histocompatibilidade de classe I
MnPV	Papilomavírus que afeta a espécie <i>Mastomys natalensis</i>
Mut	Fenótipo quanto a utilizao de metanol (Methanol utilization)
ORF	<i>Open reading frame</i> ou quadro aberto de leitura
p53	Proteína 53 – Fator de transcrio que regula o ciclo celular
PCR	Reao em cadeia da polimerase
PEX8	Gene que codifica a proteína da matriz peroxissomal
PEG	Polietilenoglicol
PGK1	Gene que codifica a enzima 3-fosfoglicerato quinase
pRb	Proteína do retinoblastoma – supressora de tumor

PMSF	<i>phenylmethanesulphonyl fluoride</i>
PV	Papilomavírus
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
Ser	Serina
<i>Sh ble</i>	Gene que confere resistência à droga Zeocina relacionada a bleomicina
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
Thr	Treonina
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i>
VLPs	Partículas semelhantes ao vírus (virus-like particles)
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
<i>YPT1</i>	Gene que codifica uma GTPase envolvida na secreção

RESUMO

Os papilomavírus são conhecidos por causarem lesões tumorais, geralmente benignas, em tecidos epiteliais de diversos organismos, que podem sob condições adequadas progredirem para o câncer. O papilomavírus bovino (BPV) tem sido amplamente caracterizado tanto por ser considerado um modelo experimental para o estudo do papilomavírus humano (HPV), quanto por sua grande importância na bovinocultura. Estudos para o combate da infecção mostram que vacinas baseadas em *virus-like particles* (VLPs), formadas a partir das proteínas capsidiais L1/L2 ou L1, induzem à produção de anticorpos neutralizantes conferindo proteção contra o mesmo tipo viral. A levedura *Pichia pastoris* é um sistema de expressão eficiente e de baixo custo para produção de altos níveis de proteínas, além de apresentar vantagens em relação a outros sistemas. Neste trabalho foi avaliado a possibilidade do uso do sistema de expressão heteróloga baseado em células da levedura *P. pastoris* para a produção da proteína L1 do capsídeo do papilomavírus bovino tipo 1. O gene L1 foi amplificado por PCR a partir do genoma completo de BPV 1, clonado no vetor pGEM-T *Easy* e subclonado sob a regulação do promotor *AOX1* e em fase de leitura com uma cauda de poli-histidina presentes no vetor pPICZA. As células da levedura foram transformadas com a construção pPICZAL1B1 e os recombinantes resistentes a zeocina foram selecionados para expressão da proteína L1. Estes foram cultivados em frascos contendo meio com glicerol como fonte de carbono e após 48 horas o meio foi trocado por outro contendo 0,5% de metanol. A cada 24 horas foi adicionado metanol para uma concentração final de 2%, até completar 96 horas. Os resultados obtidos mostraram que os recombinantes *P. pastoris* transformados com o cassete de expressão pPICZAL1B1, após indução com metanol, foram capazes de expressar o gene L1 e de produzir a proteína L1 de BPV 1. Tais transformantes permitirão o estabelecimento de um sistema de expressão da proteína L1 e conseqüente produção de VLPs como primeiro passo para implementação de uma estratégia vacinal contra infecções por papilomavírus.

Palavras-Chave: BPV, Papilomavírus Bovino, *Pichia pastoris*, Sistema de expressão heterólogo.

ABSTRACT

Papillomaviruses are known to cause lesions, usually benign, in epithelial tissues of various animals. However, under appropriate conditions, they may progress to cancer. The bovine papillomavirus (BPV) has been widely characterized by both be considered an experimental model for studying the human papillomavirus (HPV), as per its importance in cattle. Studies to contend PV infection show that vaccines based on virus-like particles (VLPs), formed from L1/L2 or L1 capsid proteins, induce production of neutralizing antibodies conferring protection against the same viral type. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, as a cellular host for the expression of recombinant proteins, is a system of efficient and low cost production of high levels of protein, with some advantages over other systems. The aim of this work was evaluated the possibility of using heterologous expression system based on *P. pastoris* yeast cells for production of BPV 1 L1 capsid protein. The L1 gene was amplified by PCR, cloned into pGEM-T Easy cloning vector and subcloned under the regulation of AOX1 promoter and in frame with a histidine tag in the C-terminal region into the *P. pastoris* expression vector pPICZA. The recombinant plasmid, named pPICZAL1B1, was linearized and used to transform *P. pastoris* by electroporation. The recombinant yeast cells were grown in YPDS plates and colony PCR was performed to confirm gene integration. After methanol induction, total RNA was extracted and the L1 transcripts were detected by RT-PCR. Finally, a dot blot assay using anti-His and anti-L1 antibodies were performed and the production of BPV 1 L1 protein was verified. The results showed that the *P. pastoris* recombinants transformed with pPICZAL1B1 expression vector, after methanol induction, were able to express BPV 1 L1 gene and produce its protein. Such transformants will allow the establishment of L1 protein expression system and consequent production of VLPs as the first step towards implementing a vaccine strategy against papillomavirus infections.

KEY WORDS: BPV, Bovine Papillomavirus, *Pichia pastoris*.

1. INTRODUÇÃO

Infecções pelos membros da família Papillomaviridae têm sido reconhecidas e descritas há milênios. Estes vírus causam alterações tumorais, geralmente benignas, em tecidos epiteliais de diversas espécies de mamíferos, répteis e aves.

O papilomavírus bovino (BPV) tem sido amplamente caracterizado tanto por ser considerado um modelo experimental ideal para o estudo do papilomavírus humano (HPV), quanto por sua grande importância na bovinocultura, sendo associado à papilomatose cutânea, tumores na bexiga (hematúria enzoótica) e no trato digestivo superior (caraguatá). A papilomatose bovina, embora não caracterize um processo neoplásico, é uma doença importante economicamente por causar desvalorização dos animais a serem comercializados.

Para o controle das infecções causadas por papilomavírus e diminuição dos problemas econômicos causados pelas infecções, têm-se optado freqüentemente pela autovacinação. Esta vacinação é feita com extrato bruto de verrugas tratadas para inativação do vírus, uma vez que não existem vacinas comerciais disponíveis, sejam preventivas ou terapêuticas.

A proteína L1 que forma o capsídeo viral, quando produzida em sistemas de expressão eucarióticos, é capaz de se organizar como *virus-like particles* (VLPs – partículas semelhantes ao vírus), com morfologia similar ao vírus selvagem. As VLPs não são infecciosas ou oncogênicas, portanto, são candidatas atrativas para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra os papilomavírus.

O sistema de expressão em células de levedura contorna várias das dificuldades encontradas no sistema de expressão em células de mamíferos, mantendo muitas de suas vantagens. A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* emergiu como um sistema eficiente e de baixo custo para a produção de altos níveis de proteínas heterólogas. Este sistema combina as vantagens da expressão em células de mamíferos com as de células procariotas, tais como a

capacidade de realizar as modificações pós-traducionais e de obter níveis elevados de expressão da proteína recombinante, respectivamente. Desta forma, tal sistema de expressão encontra-se bem estabelecido e sendo largamente utilizado para produção de diferentes tipos de proteínas heterólogas, no entanto, tem sido pouco explorado para produção de proteínas de papilomavirus, em especial do BPV. Portanto, este trabalho teve como finalidade avaliar a capacidade de expressão da proteína estrutural L1 de BPV-1 em células da levedura *P. pastoris*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Papilomavírus

A família Papillomaviridae é um grupo muito heterogêneo de vírus, e diferentes tipos são associados com lesões epiteliais específicas. São pequenos vírus, com 52-55 nm de diâmetro, possuindo DNA de fita dupla circular, com cerca de 8 Kb. O capsídeo é formado por 72 subunidades (capsômeros ou pentâmeros), com arranjo icosaédrico, sendo por este motivo, de aparência esférica à microscopia eletrônica (de Villiers *et al.*, 2004).

Os papilomavírus são identificados pela abreviação PV e uma ou duas letras iniciais indicam a espécie hospedeira, que pode ser derivada de uma palavra em inglês, por exemplo, HPV para papilomavírus humano, ou do nome científico do hospedeiro, como exemplo MnPV para papilomavírus *Mastomys natalensis*, que afeta um rato africano (Bernard, 2005).

Embora os primeiros tipos de PV tenham sido isolados há 30 anos (Orth *et al.*, 1977), a dificuldade em encontrar sistemas de cultivo de células apropriados para propagação do vírion tem freado o progresso no estudo das funções virais e limitado o estabelecimento de uma taxonomia baseada em propriedades biológicas.

Os papilomavírus foram originalmente classificados junto com os poliomavírus e SV40 (*simian virus 40*) em uma família, designados Papovaviridae. Esta antiga classificação foi baseada na similaridade entre seus membros, como por exemplo, o capsídeo não envelopado e o genoma de DNA dupla fita circular. Posteriormente, com o avanço nos estudos, foram descobertas diferenças significativas entre esses dois grupos de vírus, como o tamanho diferente dos seus genomas e a organização genômica completamente distinta entre eles, o que gerou a separação em duas famílias, Papillomaviridae e Polyomaviridae (de Villiers *et al.*, 2004).

Os PV estão etiológicamente implicados no desenvolvimento de tumores benignos (verrugas, papilomas), câncer cervical e outros tumores epiteliais, que são induzidos em locais específicos na pele e no epitélio das mucosas (Howley & Lowy, 2001). As lesões causadas são geralmente benignas, e a infecção é normalmente eliminada por uma resposta imune celular, a qual é direcionada contra antígenos virais (O'Brien & Campo, 2002). Infecções do epitélio por tipos específicos de PV, em associação com co-fatores ambientais e genéticos, podem apresentar maior risco de progressão a tumores malignos (zur Hausen, 2002).

Papilomavírus são considerados espécie-específicos e, mesmo em condições experimentais, não infectam nenhum outro hospedeiro além daquele que lhe é natural. São relatadas infecções por PV em diversas espécies de mamíferos, aves e répteis (Bernard, 2005). O único caso conhecido de infecção cruzada é a ocorrida entre cavalos e outros eqüinos pelos papilomavírus bovinos (BPV) tipo 1 e 2 (Campo, 2002).

2.1.1. Papilomavírus Bovino (BPV)

Até pouco tempo atrás, os BPVs estavam classificados em 6 tipos bem caracterizados. Os BPV 1, 2 e 5 infectam o epitélio cutâneo, onde induzem a produção de fibropapilomas com o envolvimento dos fibroblastos da derme e dos queratinócitos. Já os BPV-3, 4 e 6 estão intimamente relacionados aos papilomas epiteliais, onde somente os queratinócitos estão comprometidos, por isso são chamados papilomas epiteliotrópicos (Jarrett *et al.*, 1984; Campo, 1997a).

A nomenclatura atual, que leva em consideração as propriedades biológicas e organização do genoma, os epiteliotrópicos (BPVs 3, 4 e 6) são definidos como gênero Xi-papilomavírus, os BPVs 1 e 2 como Delta-papilomavírus e o BPV 5 é membro único do Epsilon-papilomavírus (de Villiers *et al.*, 2004).

Existem evidências da existência de 11 outros tipos ou sub-tipos de BPV, com base no seqüenciamento do material genético viral detectado por PCR (reação em cadeia pela polimerase) no pequeno rebanho bovino do Japão (Ogawa *et al.*, 2004), indicando uma provável subestimativa dos tipos de BPV circulantes.

Recentemente, quatro novos tipos de BPVs foram caracterizados. Análises filogenéticas baseadas na ORF (*open reading frame*) L1 classificaram um isolado de BPV no Japão como BPV 7, originando um novo gênero na família Papillomaviridae (Ogawa *et al.*, 2007). O BPV 8 também foi isolado no Japão e análises filogenéticas foram usadas para classificar esse novo tipo no gênero Epsilon-papilomavírus, junto ao BPV 5 (Tomita *et al.*, 2007). Por sua vez, os BPVs 9 e 10 também foram isolados de lesões papilomatosas no gado do Japão, sendo classificados como novos membros do gênero Xi-papilomavírus (Hatama *et al.*, 2008).

Para identificação de novos tipos de PV, o gene L1 tem sido utilizado por ser o mais conservado do genoma. Um novo PV isolado é reconhecido como tal se a seqüência de DNA da ORF L1 divergir em mais de 10% do tipo de PV conhecido mais próximo. Diferenças entre 2% e 10% na homologia definem um subtipo e menor que 2% um variante (de Villiers *et al.*, 2004).

2.2. Papilomatose Bovina

Nos bovinos são mais comuns papilomatoses cutânea e nas mucosas genital e orofaríngea, não havendo diferença na prevalência da patologia entre sexo e raças, sendo mais freqüente em animais com menos de dois anos de idade (Corrêa & Corrêa, 1992).

As lesões hiperplásicas produzidas pelos papilomavírus, definidas como verrugas, papilomas ou condilomas, são geralmente lesões benignas (Munoz, 2000). No entanto, o gado

pode apresentar processos neoplásicos derivados da malignização de papilomas pré-existent, devido à ação sinérgica de co-fatores ambientais (Campo, 2002; Leal *et al.*, 2003). Tais anomalias acompanhadas de outras modificações celulares induzidas por co-fatores ambientais, como, por exemplo, o consumo da samambaia *Pteridium aquilinum* v. *aracnoideum*, podem causar o desenvolvimento de câncer (Jackson *et al.*, 1993; Campo, 1997a; Moura *et al.*, 1988; Campo, 2002).

No Brasil, a papilomatose bovina é um importante problema econômico para os criadores, existindo regiões em que a papilomatose é endêmica (Vale do Paraíba – SP). Na região Nordeste, em especial no Estado de Pernambuco (região da Zona da Mata), a incidência de papilomatose bovina é muito alta provocando grandes perdas econômicas para os criadores (Melo & Leite, 2003).

As lesões mais comuns associadas à infecção em bovinos são: papilomas na pele causados por BPV 1, 2 e 3; papilomas e câncer no trato gastrointestinal superior por BPV 4; papilomas nos tetos e úbere por BPV 1, 5 e 6; papilomas no pênis, BPV 1; e câncer na bexiga urinária de animais acometidos por BPV 1 e 2 (Jarret *et al.*, 1984; Campo, 1998; Jelinek & Tachezy, 2005).

As tetas e o úbere das vacas estão sujeitas à infecção por três diferentes tipos de BPV. A doença, se causada especialmente por BPV 6, torna-se não apenas um problema de saúde, mas também causa grandes conseqüências econômicas, já que as vacas ficarão impossibilitadas de amamentar os bezerros e, além disso, os papilomas podem fechar os canais das tetas tornando o local propenso para infecção por bactérias (Campo, 1998). Papilomatose no pênis interfere com as funções normais de touros reprodutores e os animais têm que ser sacrificados (Campo, 2002).

Além das verrugas comumente associadas, BPV 1 e 2 também estão implicados em lesões neoplásicas. BPV 2, e menos comumente BPV 1, estão relacionados ao processo carcinogênico da bexiga urinária (Borzacchiello *et al.*, 2003). Eles estão comumente associados com uma síndrome conhecida como hematúria enzoótica, a qual é causada pela ingestão prolongada de brotos de samambaia (Confer & Panciera, 2001). Estudos prévios têm apontado para uma ação sinérgica entre BPV e compostos da samambaia (*Pteridium aquilinum*), como a quercetina (Campo, 2002; Leal *et al.*, 2003), como esquematiza a figura 1. O DNA viral está presente nos tumores em múltiplas cópias episomais, porém não há registros da presença de partículas virais (Campo *et al.*, 1992).

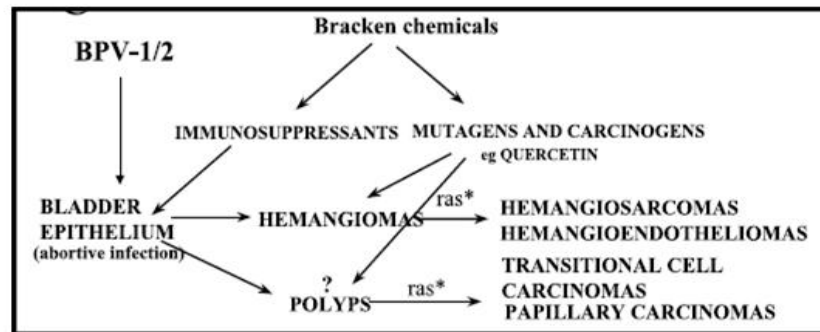


Figura 1. Representação diagramática da carcinogênese em bexiga urinária (Campo, 2002).

Embora os papilomavírus sejam considerados extremamente espécie-específicos, o BPV 1, e o BPV 2 em menor frequência, são encontrados em tumores fibroblásticos de eqüinos denominados tumores sarcóides (Nasir & Reid, 1999; Campo, 2003).

O sarcóide eqüino é o mais comumente tumor da pele detectado em eqüinos em todo o mundo e tem sido relatada sua presença em cavalos, burros e mulas (Goldschmidt & Hendrick, 2002), com relatos de taxas de prevalência de 12.9 a 67% de todos os tumores de eqüinos. O sarcóide pode ser definido como tumores fibroblásticos benignos localmente agressivos da pele eqüina (Nasir & Campo, 2008) e pode ocorrer como lesões únicas ou múltiplas em diferentes formas, desde pequenas lesões parecidas com verrugas até grandes

úlceras fibrosas. As lesões podem ocorrer em todo o corpo, mas existem sítios de predisposição em especial na região paragenital, no tórax-abdome e na cabeça e, freqüentemente, ocorrem em locais de lesão prévia e cicatrizes (Torrontegui & Reid, 1994).

A biologia molecular da infecção pelo BPV-1 em sarcóide eqüinos assemelha a da infecção por BPV-2 na bexiga urinária em bovinos: em ambos os casos, a infecção é abortiva e não produtiva, as proteínas precoces (proteínas E), incluindo a principal oncoproteína E5, são consistentemente expressas, fornecendo evidências claras que a presença do DNA viral não é acidental; as proteínas tardias (proteínas L) são ocasionalmente detectadas, mas não se observa partículas virais, sugerindo que a infecção é abortiva numa fase tardia (Chambers *et al.*, 2003; Nasir & Campo, 2008).

O BPV 4 infecta o epitélio da mucosa gastrointestinal (GI) superior e induz a formação de papilomas pela expressão de suas proteínas transformantes. Os órgãos mais comumente afetados são faringe, esôfago, rúmem e retículo. Animais que desenvolvem papilomatose extensiva têm dificuldade de comer e respirar e são descartados. Porém, se a doença não é tão severa, os animais sobrevivem, mas apresentam alto risco de desenvolverem carcinoma de células escamosas (Campo, 2002). Epidemiológica e experimentalmente evidenciou-se que papilomas causados por BPV 4 podem evoluir para carcinomas de células escamosas em animais alimentados com samambaia (Campo *et al.*, 1994).

Apesar de serem reconhecidamente vírus epiteliotrópicos (Campo, 1997b), há evidências da presença de BPV em células do sangue periférico (Stocco dos Santos *et al.*, 1998; Freitas *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2007), placenta, sêmen e fluidos corpóreos (Carvalho *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2007), sendo sugerida a transmissão vertical de BPV 1 e 2. No sangue periférico, Stocco dos Santos *et al.* (1998) sugeriram a ação do BPV sobre a cromatina hospedeira, de modo que tal ação, causa alterações cromossômicas características como fusões cêntricas na célula hospedeira.

2.3. Genoma de BPV

O genoma do papilomavírus bovino consiste em um DNA de fita dupla circular com cerca de 8000 pares de bases e pode ser dividido em três segmentos: a região LCR (*Long Control Region*) contendo os elementos *cis*-regulatórios necessários para a replicação e transcrição do DNA viral, e duas regiões contendo quadros abertos de leitura (ORF ou *open reading frames*) correspondentes aos genes precoces e tardios. Os genes precoces codificam as proteínas envolvidas tanto nos processos de replicação e transcrição do DNA viral quanto na transformação celular (Campo, 2006). Os genomas de BPV-3, BPV-4 e BPV-6 perderam a ORF E6, que foi substituída por E5 (originalmente definida como E8), enquanto que a maioria dos tipos de PV, BPV-1, BPV-2 e BPV-5 ainda mantêm esse gene (Borzacchiello & Roperto, 2008). A figura 2 ilustra a organização genômica de BPV.

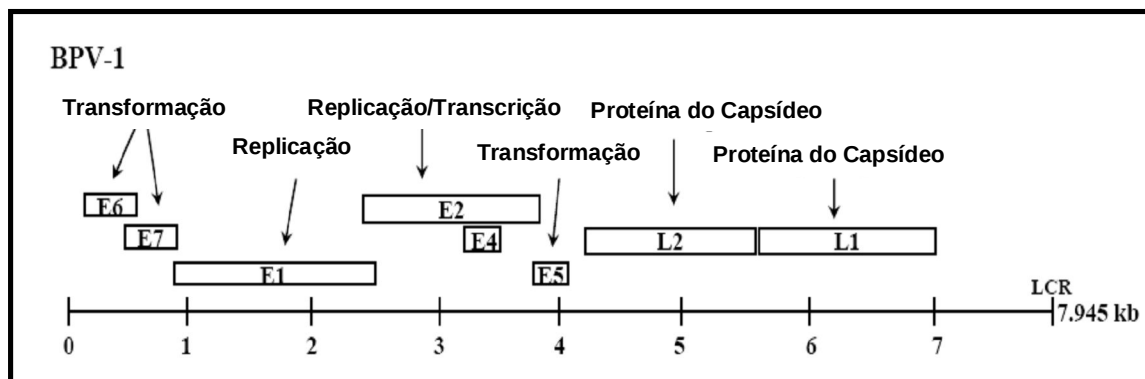


Figura 2. Representação linear do genoma de BPV 1, adaptado de Campo, 2006.

A região LCR (também denominada região URR - *Upstream Regulatory Region*) é uma área não codificante do genoma viral de aproximadamente 500-1000 nucleotídeos, dependendo do tipo do papilomavírus, situada entre o terminal 3' da ORF tardia e o terminal 5' da ORF precoce. Essa região contém a maioria ou todos os sinais regulatórios tanto para replicação quanto para a transcrição do DNA viral (Nicholls & Stanley, 2000; Munger & Howley, 2002).

A LCR do BPV-1, BPV-2 e BPV-5 tem doze sítios de ligação à E2, enquanto que quatro sítios de ligação à E2 são reconhecidos nas LCR de BPV-3, BPV-4 e BPV-6. E2 é o regulador da transcrição viral, e sua ligação à LCR pode ativar ou reprimir a transcrição dos genes virais (Borzacchiello & Roperto, 2008). No entanto, a LCR de BPV-4 possui múltiplos elementos regulatórios positivos e negativos capazes de agir independentemente da presença de E2. Dentre estes, o fator de transcrição celular melhor caracterizado é o PEBP2, que se liga ao sítio de E2 (Jackson & Campo, 1995).

A expressão dos genes virais ocorre através de um complexo padrão de eventos de processamento de RNA (*RNA splicing*) que processam um mRNA maduro a partir de um precursor de RNA policistrônico, tanto em Delta- quanto em Xi-BPVs (Campo, 2006). Como uma regra geral, os transcritos tardios codificando as proteínas estruturais são encontrados apenas nas camadas mais diferenciadas de verrugas e outras lesões produtivas, enquanto que RNAs codificando as proteínas precoces são encontradas tanto em verrugas como em células transformadas.

As ORFs são classificadas como não-estruturais ou precoces (E, do inglês *early*) e estruturais ou tardias (L, do inglês *late*), de acordo com o período de expressão. O segmento E representa 45% do genoma e codifica para proteínas que são necessárias para a replicação e transcrição do DNA viral e podem subverter a proliferação celular, finalmente induzindo à transformação celular (Campo, 1997a).

A proteína E1 tem função na replicação do DNA viral, permite o desenrolar do genoma viral e age como fator de alongação (Lambert, 1991). O produto do gene E2 está envolvido tanto no controle da transcrição quanto na replicação do DNA viral, sendo responsável pelo reconhecimento e ligação da origem de replicação. A proteína E2 existe em duas formas. A proteína íntegra do gene E2 tem a função de reprimir a transcrição em certas

condições, já a proteína em sua forma N-terminal atua como ativador transcricional (Yang *et al.*, 1991).

Outra relevante função de E2 é a sua capacidade de segregar o genoma epissomal de BPV para as células-filhas, após a divisão celular, através da ligação do genoma ao cromossomo mitótico, garantindo assim a igualdade de distribuição e retenção do DNA viral (Baxter *et al.*, 2005). A proteína E2 de BPV-1 associa com a cromatina mitótica através do domínio aminoterminal da proteína e uma vez ligada é capaz de interagir com o genoma viral via dimerização do terminal carboxila e domínio de ligação ao DNA. Para a associação de E2 com a cromatina mitótica, o estado fosforilado da proteína E2 não é requerido, e é provável que a proteína celular Brd4 é a responsável pela interação de E2 com os cromossomos mitóticos (Campo, 2006).

A ORF E4 codifica uma família de pequenas proteínas que são geradas por *splicing* alternativo e modificações pós-traducionais. Essa proteína encontra-se em abundância no citoplasma de queratinócitos ajudando a fase produtiva de replicação do DNA viral. Em cultura de células e em infecções naturais, E4 interage com a rede de filamentos de citoqueratinas, onde provavelmente desempenha um papel auxiliar na replicação e liberação do vírus (Doorbar, 1991; Borzacchiello & Roperto, 2008).

BPV codifica três oncoproteínas, E5, E6 e E7. E5 é a principal oncoproteína viral seguida por E6, com um papel mais modesto desempenhado por E7.

A proteína E6 de BPV é um ativador transcricional, que interage com e inibe o co-ativador de transcrição CBP/p300 e, em fazendo-o também inibe a função do supressor tumoral p53 (Zimmerman *et al.*, 2000), alcançando assim o mesmo resultado que as proteínas E6 de Alfa-HPVs, ou seja, a inativação do ciclo celular e apoptótico detendo as funções de p53. E6 liga à proteína de adesão focal paxillina e bloqueia a interação entre paxillina e vários

outras proteínas de adesão focal, incluindo vinculina e quinase de adesão focal. Além disso, E6 interage com AP-1, um complexo adaptador *trans*-Golgi rede-específica de clatrina, e é provável que esta interação afeta os processos celulares envolvendo vias de tráfego mediado por clatrina (Nasir & Campo, 2008). Apesar de sua importância, o Xi-PVs não têm um gene E6, que tem sido substituído por um gene semelhante a E5.

O gene E7 de BPV-1 codifica uma proteína de 127 aminoácidos, que coopera com E5 e E6 na indução de transformação celular. Em células infectadas naturalmente, a expressão de E7 de BPV-1 é observada no citoplasma e nucléolos das células basais e inferiores da camada espinhosa, enquanto que a expressão de E7 de BPV-4 é observada em todas as camadas de papilomas, em todas as fases (Borzacchiello & Roperto, 2008). A proteína E7 de papilomavírus humano (HPV) tipo 16 (o vírus associado com carcinoma cervical) interage com e inibe o supressor tumoral p105Rb. Esta inibição leva à proliferação celular imprevista. Contrariamente ao E7 de HPV-16, E7 do gênero Delta-BPV perde o domínio canônico de ligação à p105Rb LXCXE e ainda não é claro como é que ela contribui para a transformação celular (Nasir & Campo, 2008).

O gene E5 codifica uma pequena proteína hidrofóbica de membrana com aproximadamente 84 aminoácidos, que é a principal oncoproteína dos papilomavírus bovino. Essa proteína provoca perturbação nos mecanismos de supressão do crescimento e no controle do ciclo celular. Está localizada nos compartimentos das endomembranas das células, especialmente no aparelho de Golgi, e liga-se a ductina 16 k/subunidade c da ATPase H⁺ vacuolar. Esta interação resulta na inibição da comunicação intercelular das junções gap e a falta de acidificação dos endossomos e do aparelho de Golgi (Goldstein *et al.*, 1991).

A perda da comunicação das junções gap em células transformadas com papilomavírus provavelmente contribui para a transformação celular por isolamento das células infectadas das células normais circunvizinhas, permitindo então o estabelecimento de

outros eventos de transformação (Nasir & Campo, 2008). A inibição da acidificação dos endossomos e do aparelho de Golgi leva a perturbação do processamento de proteínas celulares, resultando na retenção e reciclagem de receptores de fatores de crescimento celular dos compartimentos endossomais (Campo, 2006).

Adicionalmente, E5 de BPV interage diretamente e ativa o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R), ativando uma cascata de sinalização intracelular para a proliferação celular (Borzacchiello *et al.*, 2006), e ativa diversas proteínas quinases envolvidas no controle do ciclo celular causando uma desregulação generalizada do programa de proliferação da célula (Nasir & Campo, 2008).

O genoma viral também contém os genes tardios que codificam as duas proteínas que compõem o capsídeo do vírus. A proteína L1 é a principal proteína do capsídeo viral com um peso molecular de 55 KDa, representando cerca de 80% do total de proteínas. Já a proteína L2 corresponde a uma pequena porção do capsídeo com peso molecular de 77 KDa (Buck *et al.*, 2005). As proteínas L1 e L2 são expressas no núcleo dos queratinócitos diferenciados. Durante a morfogênese do vírion, L2 liga-se ao DNA viral, favorecendo a sua encapsidação. Já L1 medeia a ligação do vírus aos receptores da superfície celular. Ambas as proteínas codificam epitopos neutralizantes e, no caso de L2 de BPV-2, epitopos de rejeição tumoral (Campo, 2006; Borzacchiello & Roperto, 2008).

2.4. Relação Parasito-Hospedeiro

O ciclo de infecção do papilomavírus está intrinsecamente relacionado aos estágios de diferenciação das células epiteliais do hospedeiro (O'Brien & Campo, 2002), como mostra a figura 3. A replicação viral ocorre nas camadas basais do epitélio escamoso estratificado da pele ou de membranas mucosas e, provavelmente, os vírus têm acesso às células do nível

inferior através de lesão e/ou abrasão. O vírus atinge o núcleo das células basais através de microlacerações, sendo que os primeiros sinais de transcrição do genoma viral aparecem cerca de 4 semanas após a infecção (Buck *et al.*, 2005).

Uma vez infectadas, as células epiteliais são transformadas pelo PV para a indução da hiperplasia e hipertrofia destas. O vírus infecta os queratinócitos basais expressando os genes virais precoces nas camadas basal e suprabasal do epitélio e replica seu genoma durante a diferenciação da camada espinhosa e granular. Com a diferenciação das células, a expressão dos genes tardios é ativada e as proteínas do capsídeo viral L1 e L2, juntamente com a proteína E4 (possivelmente relacionada com a replicação e a encapsidação do DNA viral) nas camadas escamosas. Os vírions são formados e finalmente liberados com a descamação da camada queratinizada (O'Brien & Campo, 2002). À medida que os vírus amadurecem e as partículas virais se agrupam, eles migram em direção à superfície, conseqüentemente, vírus completos são encontrados apenas nas camadas epiteliais superiores. Este gradiente de replicação e diferenciação do epitélio basal para o epitélio apical tem implicações significativas para a detecção e o tratamento das infecções relacionadas ao PV (Howley & Lowy, 2001), uma vez que é difícil a reprodução fiel desse ambiente celular em cultivo celular.

Assim como muitos vírus, BPVs podem estabelecer uma infecção latente. O genoma viral pode ser freqüentemente encontrado em epitélios normais, sem sinais clínicos da doença (Ogawa *et al.*, 2004). Epitélios normais são sítios aceptores de infecção latente e, aliás, a reativação do BPV em locais de trauma sugere que o DNA viral está presente nestes sítios em forma latente, e que os danos do epitélio, possivelmente através da produção de citocinas inflamatórias e do estímulo da proliferação celular, induz a expressão de genes virais levando à formação de papiloma (Campo, 2006). No entanto, epitélios podem não ser o único sítio de

latência do papilomavírus. DNA de BPV está presente em forma episomal nos linfócitos circulantes de bovinos.

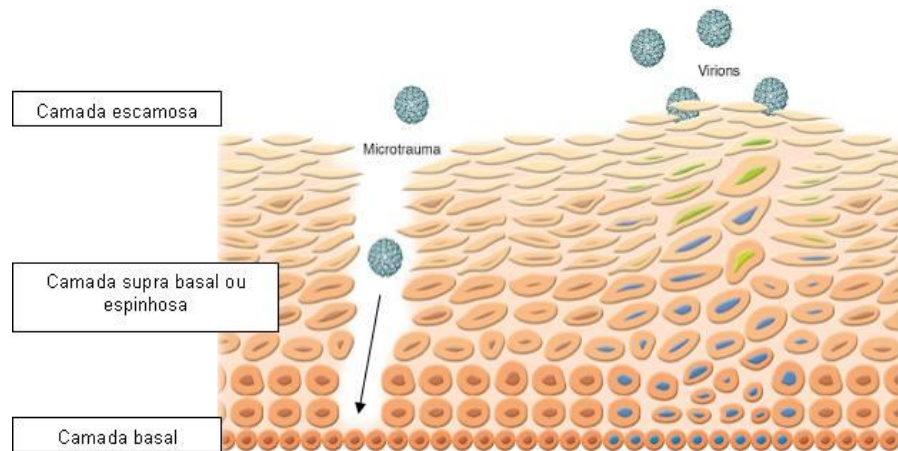


Figura 3. Ciclo de infecção do PV. Entrada do vírus no tecido epitelial através de microtrauma e estabelecimento da infecção na camada basal (células com núcleo azul). As células de núcleo verde indicam a expressão das proteínas L1 e L2 para montagem dos vírions que são liberados posteriormente (adaptado de Lowy & Schiller, 2006).

2.4.1. Processo Carcinogênico

Embora a etiologia viral de tumores esteja bem estabelecida, os mecanismos moleculares envolvidos nesta transformação não estão bem entendidos. O DNA viral não está presente no tumor ou em células transformadas *in vitro*, sugerindo que o vírus é responsável pelos eventos iniciais da carcinogênese, mas não pela manutenção das transformações fenotípicas, onde a informação genética viral não é necessária para a manutenção da malignidade (Gaukroger *et al.*, 1991). Também não está claro como fatores carcinogênicos e agentes promotores estão envolvidos em diferentes estágios no desenvolvimento de papilomas e carcinomas, porém já foram descobertos dois estágios do mecanismo de carcinogênese, a iniciação e a promoção, que têm componentes independentes (Frazer, 1996).

Nos últimos tempos, as proteínas E6 e E7 do papilomavírus humano foram foco de muitos estudos para se obter um melhor entendimento do processo carcinogênico. Durante este período, surgiram dois modelos de interação com proteínas supressoras de tumor,

esquematizado na figura 4, onde E6 se liga à proteína p53 e E7 se liga à proteína pRb, inativando e degradando tais supressores (Storey *et al*, 1988; Werness *et al*, 1990). Esta descoberta não foi tão surpreendente pelo fato de que outros vírus oncogênicos também têm essas mesmas proteínas como alvo (Zur hausen, 1998; Butel, 2000).

A proteína p53 tem como função ativar genes de mecanismo de reparo do DNA ou sinalizar para apoptose após identificar danos no mesmo, provenientes de diferentes tipos de stress, como a exposição à UV (Silva *et al*, 2003). Quando presente na célula, a proteína viral E6 recruta a proteína celular E6AP (ubiquitina-ligase), para ubiquitinação e degradação de p53 (Stubenrauch & Laimins, 1999). Sem a proteína p53 a célula perde a capacidade de reparar possíveis danos no seu material genético e há um aumento na frequência de rearranjos, mutações e aneuploidias, que acumulados propiciam o desenvolvimento de uma neoplasia ou câncer (Vousden, 1993).

As proteínas da família pRb inibem a progressão do ciclo celular pela interação com o fator de transcrição E2F, que ativa genes necessários para a replicação, na fase S (Silva *et al*, 2003). A proteína codificada pelo gene E7 se liga a pRb, fosforilando e, por consequência, inativando a pRb, promovendo a continuidade do ciclo celular e permitindo a replicação dos genes virais (McCance, 2005).

Co-fatores, sejam ambientais ou genéticos, são necessários para as lesões induzidas por papilomavírus progredirem para câncer. Brotos de samambaia têm sido identificados como um dos principais cofatores ambientais na carcinogênese induzida por BPV em bovinos. Os brotos de samambaia contêm imunossupressores e um número considerável de mutágenos (Nasir & Campo, 2008).

A imunossupressão induzida pela samambaia está associada com duas alterações hematológicas marcantes. A primeira delas é uma queda dramática nos leucócitos polimórficos nucleares. Se não checada, ela pode levar a uma imunossupressão aguda grave

com invasão da corrente sanguínea por bactérias alimentares e a morte por septicemia. O segundo efeito da alimentação com samambaia é uma queda crônica nos linfócitos circulantes. Mesmo durante os períodos sem a presença da samambaia, a contagem dos linfócitos permanece muito baixa (Campo, 2006).

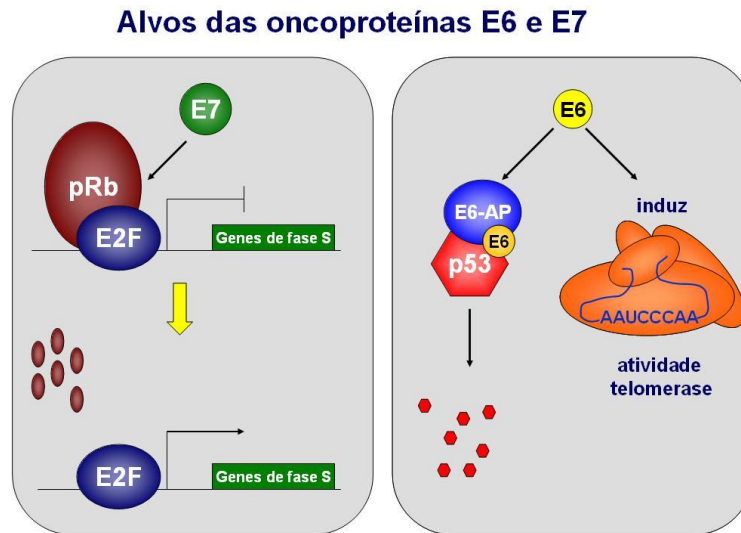


Figura 4. Esquema da ação das oncoproteínas E6 e E7 em papilomavírus humano.

Casos de câncer do trato gastrointestinal superior e inferior são encontrados em uma elevada frequência em áreas onde gado pasta em terras infestadas de samambaia. Os carcinomas do trato gastrointestinal superior provêm de papilomas induzidos por BPV-4. A contribuição dos fatores virais, imunológicos e químicos na progressão dos papilomas para carcinomas foi estabelecida pela primeira vez no campo e depois, em condições experimentais. Animais saudáveis infectados com BPV-4 rejeitaram seus papilomas causados por uma resposta imune celular. Em contrapartida, em animais imunossuprimidos pela ingestão de samambaia, os papilomas espalham-se por todo o trato gastrointestinal superior, não sofrem regressão e progridem para câncer (Campo, 2006; Borzacchiello & Roperto, 2008).

Além do câncer do trato gastrointestinal superior, o gado alimentado com samambaia desenvolve hematúria enzoótica crônica, câncer de bexiga e anomalias cromossômicas. O câncer de bexiga compreende dois tipos principais, carcinoma do urotélio e hemangioendoteliomas dos capilares subjacentes. Muitas vezes os dois tipos de tumores ocorrem juntos na mesma bexiga. O envolvimento de samambaia e BPV na carcinogênese da bexiga tem sido reconhecido por longo período. BPV-1 ou -2 infecta o epitélio da bexiga urinária e estabelece uma infecção abortiva, sem produção de vírus. A imunossupressão induzida pelos brotos de samambaia impede a rejeição do tumor e os agentes mutagênicos dos brotos contribuem para a desestabilização do genoma (Borzacchiello & Roperto, 2008; Nasir & Campo, 2008).

2.5. Resposta Imune ao Papilomavírus

Os vírus e seus hospedeiros estão continuamente brigando um com outro. O vírus deve ser capaz de superar a resposta imune do hospedeiro para replicar-se e produzir sua progênie infecciosa. No entanto, apesar da capacidade do vírus de escapar da vigilância imune, eventualmente, o hospedeiro monta uma resposta imunológica eficaz e o vírus e as células infectadas pelo vírus são eliminados (Nasir & Campo, 2008).

A resposta imune de bovinos para BPV é surpreendentemente pobre (Campo, 1998). Os animais podem carregar tumores massivos, ativamente produzindo vírus em grandes quantidades, mas os bovinos não respondem facilmente aos antígenos de BPV durante o curso da infecção e anticorpos anti-BPV são raramente detectados.

O fracasso do sistema imunitário em reconhecer a presença do vírus ou de sua progênie deve-se ao fato de que os papilomavírus possuem um ciclo de infecção restrito ao epitélio e, portanto, não estão em contato com o sistema imunológico (O'Brien & Campo,

2002). Essa interpretação é apoiada pelo fato de que animais de campo úlceras e tumores têm altos títulos de anticorpos naturais anti-BPV e uma boa resposta de anticorpos pode ser obtida após a inoculação intramuscular com vírus purificado ou proteínas virais, confirmando que apenas quando o papiloma estiver danificado, ou um limiar de natureza desconhecida é alcançado através de imunização, os antígenos virais entram em contato com as células imunes (Campo, 1998).

A resposta imune pobre para o BPV parece ser uma das principais razões da persistência de infecção: mesmo em hospedeiros imunocompetentes, os papilomas persistem por vários meses antes de ocorrer regressão. Recentemente, tem se tornado claro que, além da imunoevasão passiva devido ao ciclo de infecção viral ser confinado ao epitélio, os papilomavírus têm desenvolvido vias ativas para esquivar-se do sistema imune do hospedeiro (Campo, 2006). Entre elas, encontra-se a regulação do Complexo Maior de Histocompatibilidade de Classe I (MHC I) por E5.

O MHC I é responsável pela apresentação de peptídeos antigênicos a células T-efetoras, e desempenha um papel crítico na vigilância imune. O complexo consiste de cadeia pesada (HC ou *Heavy Chain*), β 2-microglobulina e peptídeo, e é transportado a partir do retículo endoplasmático através do aparelho de Golgi para a membrana plasmática (Ashrafi *et al.*, 2002).

Uma recente descoberta da função da proteína E5 de BPV é a repressão do MHC I (Ashrafi *et al.*, 2002; Marchetti *et al.*, 2002; Araibi *et al.*, 2006). A regulação do MHC I por E5 de BPV ocorre em vários níveis: a transcrição do gene da cadeia pesada HC do MHC I é reduzida, o peptídeo da HC do MHC I é degradado e o complexo MHC I é sequestrado nas cisternas do Golgi e é irreversivelmente impedido de chegar à superfície celular (Marchetti *et al.*, 2002; Araibi *et al.*, 2006). A retenção do MHC I na cisterna do Golgi é o resultado de pelo menos dois eventos. Em primeiro lugar, à alcalinização induzida por E5 do aparelho de Golgi

e, em segundo lugar, por uma interação física direta entre E5 e HC do MHC I (Araibi *et al.*, 2006).

Fortes evidências indicam que o processo de regressão dos papilomas seja mediado por uma resposta imune celular, enquanto que a proteção contra a infecção seja devida a anticorpos neutralizantes (Campo, 1997b). Embora a grande maioria das lesões eventualmente regrida, a resposta imune do hospedeiro frente aos antígenos virais é surpreendentemente pobre, com pouca ou nenhuma resposta humoral ou celular detectada. Alguma resposta imune pode ser normalmente detectada somente nos estágios tardios da infecção ou quando as lesões progridem para processos malignos (Konya & Dillner, 2001).

A falha do sistema imune em reconhecer os vírions pode ser explicada pelo fato de que o ciclo de infecção dos PV é não-lítico e, portanto não provoca nenhum sinal pró-inflamatório que ative células dendríticas (DC) e induza sua migração para o local da infecção. A natureza não-lítica da infecção por papilomavírus limita a produção de antígenos que são processados e apresentados ao sistema imune adaptativo (Kanodia *et al.*, 2007).

Apesar do capsídeo viral estar inacessível às células do sistema imune, as células infectadas nas camadas internas do epitélio, que estão expressando as proteínas virais precoces (E5, E6 e E7), poderiam estar sujeitas à vigilância das células efetoras antivirais, incluindo linfócitos T citotóxicos (Nicholls & Stanley, 2000). Embora estas proteínas virais sejam imunogênicas quando administradas como vacinas (Tindle, 1996), os antígenos virais não são eficientemente apresentados ao sistema imune, nem eles devem ser expressos em níveis detectáveis para o sistema imune durante a infecção natural. Isso acarretará uma ativação ineficiente das células T, resultando em uma ignorância imunológica e/ou tolerância às células infectadas (O'Brien & Campo, 2002).

2.6. Estratégias de Imunização

Vários estudos testaram a eficácia de vacinas contra infecções por PV baseados nos produtos dos genes estruturais e não-estruturais do vírus (Hu *et al.*, 2002). As vacinas terapêuticas são baseadas na indução de imunidade celular contra células expressando antígenos virais, visando a regressão das lesões. As proteínas não-estruturais, principalmente E6 e E7, são os alvos dessas vacinas, uma vez que são muito expressas em células de tumores associados a papilomavirose (Han *et al.*, 1999 ; Münger *et al.*, 2001).

As vacinas profiláticas são baseadas na indução de anticorpos neutralizantes capazes de prevenir novas infecções. Para isso, os antígenos utilizados baseiam-se nas proteínas estruturais do capsídeo viral L1 e L2 (Nicholls & Stanley, 2000; Campo, 2002). Vacinação intramuscular de bezerros com vírions purificados de BPV 2, 4 e 6 conferiu proteção dos animais frente a um desafio subsequente por infecção dos vírus (Jarrett *et al.*, 1990). Embora L2 apresente alguns epítomos capazes de induzir produção de anticorpos neutralizantes, a grande maioria destes são produzidos por VLPs (*virus-like particles* ou partículas semelhantes ao vírus) formadas por apenas L1 ou L1/L2 (Schiller & Lowy, 2001).

Anticorpos neutralizantes contra papilomavírus são altamente tipo-específicos (Roden *et al.*, 1996). A neutralização do capsídeo viral pode ocorrer de dois modos distintos: alguns anticorpos bloqueiam a ligação à célula, provavelmente por interferência estérica com o sítio do receptor; outros anticorpos inibem provavelmente a decapsidação e, conseqüentemente, a liberação do DNA viral no núcleo (Roden *et al.*, 1994; Booy *et al.*, 1998).

2.6.1. *Virus-Like Particles* (VLPs)

As VLPs são estruturas protéicas com morfologia similar aos vírions intactos, e são obtidas a partir da expressão de proteínas do capsídeo viral, que espontaneamente levam à

montagem de estruturas similares aos vírus autênticos (Zhou *et al.*, 1991; Kirnbauer *et al.*, 1992).

Vacinas contra hepatite B foram um dos primeiros produtos contendo VLPs sintetizadas, produzidas a partir de proteínas recombinantes em sistemas de expressão controlados (McAleer *et al.*, 1984).

A proteína L1 do papilomavírus (54-58 kDa) compõe 90% da estrutura capsidial e se organiza na forma de pentâmeros que estão associados à proteína L2, com peso molecular aparente de 68-76 kDa (da Silva *et al.*, 2001). O capsídeo contém 360 cópias da proteína L1 e provavelmente 12 cópias da proteína L2, organizados em 72 capsômeros icosaédricos (Modis *et al.*, 2002). A figura 5 ilustra a estrutura do capsídeo viral.

Quando expressa em sistemas eucarióticos e em alguns sistemas procarióticos, L1 possui uma propriedade intrínseca de auto-montar em uma estrutura semelhante ao capsídeo viral (VLPs) (Kirnbauer *et al.*, 1992; Aires *et al.*, 2006).

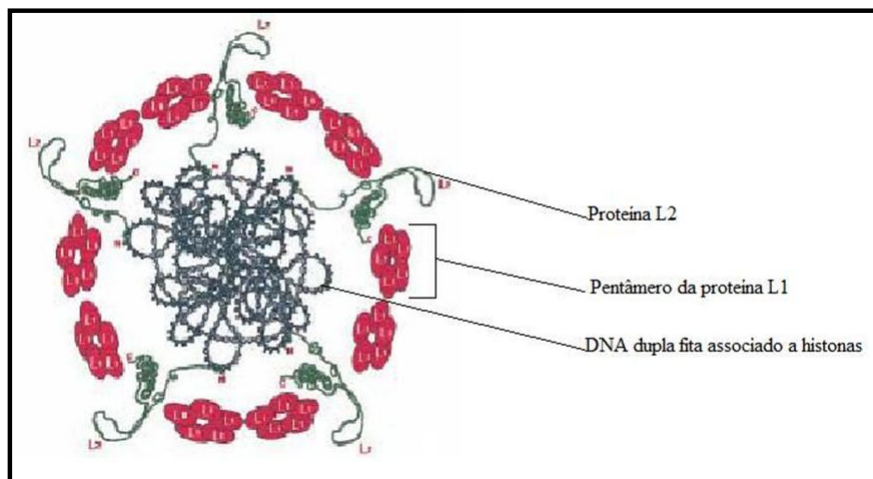


Figura 5. Ilustração da estrutura do capsídeo viral. A proteína L2 ligada ao DNA viral e atravessando o capsídeo; os monômeros da proteína L1 organizados em pentâmeros formando o capsídeo; o DNA dupla fita circular condensado por histonas (Trus, *et al.* 1997).

As VLPs podem ser obtidas pela superexpressão da proteína L1 sozinha, ou em co-expressão da proteína L2 (Kirnbauer, 1996). São indistinguíveis dos vírions nativos e preservam os epítomos conformacionais necessários à indução de anticorpos neutralizantes sendo capazes de promover resposta celular (Dupuy *et al.*, 1999; Palker *et al.*, 2001). Por não conterem o genoma viral, estas VLPs não são infecciosas ou oncogênicas e representam, portanto, uma excelente estratégia para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra os papilomavírus (da Silva *et al.*, 2001). A figura 6 ilustra a estrutura de uma VLP.

A eficiência das VLPs na indução da resposta imune e prevenção da infecção por papilomavírus foi primeiramente testada em cães (Suzich *et al.*, 1995), coelhos (Breitburd *et al.*, 1995) e bovinos (Kirnbauer *et al.*, 1996).

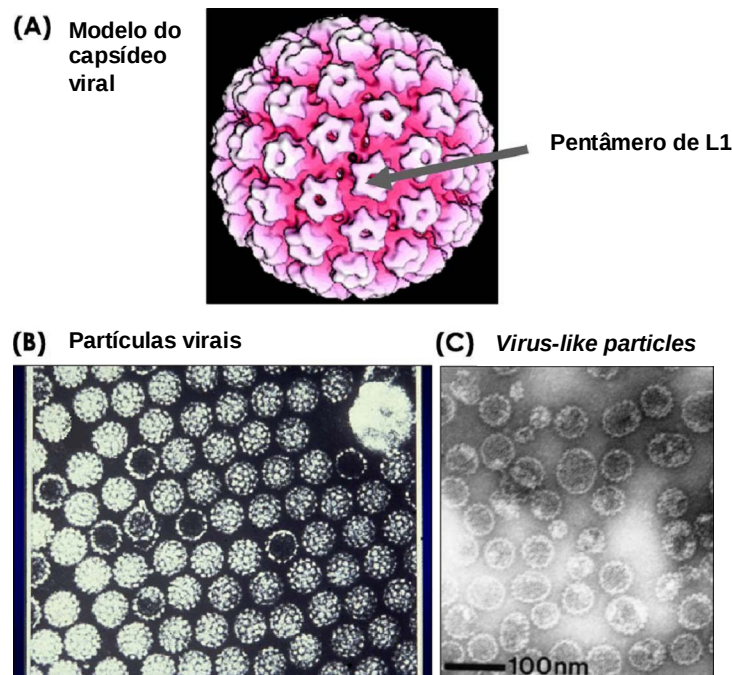


Figura 6. Ilustração da estrutura de uma VLP. (A) Modelo do capsídeo do papilomavírus; (B) Partículas virais; (C) L1 virus-like particles (VLP) [Adaptado de Chen *et al.*, 2000a].

Recentemente, foram aprovadas pela FDA (*Food and Drug administration*) duas novas vacinas profiláticas contra o papilomavírus humano. Uma é produzida pela *Merck*,

chamada *Gardasil*[®] que inclui os quatro tipos de HPV's mais prevalentes no mundo (HPV-16, 18, 6 e 11) e engloba a imunização de mulheres com idade entre 9-26 anos (Barr & Tamms, 2007). A segunda vacina, produzida pela *GlaxoSmithKline*, denominada *Cervarix*[®], engloba VLPs de apenas dois tipos oncogênicos (16 e 18) do HPV (Roden & Wu, 2006).

2.7. Sistemas Heterólogos de Expressão

Durante as últimas décadas, cientistas vêm aprendendo cada vez mais como manipular o material genético de diferentes organismos, realocando-o numa variedade de outros organismos, denominados recombinantes. O principal uso de tais organismos recombinantes é a produção de proteínas. Tendo em vista que muitas proteínas possuem um imenso valor comercial, numerosos estudos têm focado em novas maneiras de produzir proteínas funcionais, em grandes quantidades e a baixo custo (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Um sistema ideal de expressão de genes heterólogos deve levar em consideração as características e as futuras aplicações dos compostos expressos a partir do gene de interesse. Esses critérios são ditados predominantemente tanto por questões econômicas, quando estiver tratando de produção de enzimas de interesse industrial, como por questões de biosegurança, se considerar a produção de fármacos (Strasser & Gellissen, 1998).

Dentre os sistemas de expressão procariotos, a bactéria *Escherichia coli* é o organismo mais utilizado e extensivamente estudado como produtora de proteínas heterólogas (Liljeqvist & Stahl, 1999). Tal sistema apresenta vantagem econômica por crescer em meios simples e baratos e pode atingir bons níveis de produção. Entretanto, existem muitas dificuldades associadas à produção de proteínas a partir de genes exógenos clonados nesta bactéria (Morton & Potter, 2000).

A produção de proteínas eucarióticas, que requerem modificações pós-traducionais, em um sistema procariótico tem sido problemática porque esse simples microrganismo não possui a maquinaria intracelular necessária para tal finalidade. Proteínas recombinantes produzidas com sucesso em *E. coli* estão muito dependentes das características primárias, secundárias, terciárias e funcionais da proteína de interesse. Como *E. coli* é um procarioto, a inabilidade de processar corretamente as proteínas heterólogas e realizar outras modificações pós-traducionais, tais como glicosilações e fosforilações, limita os tipos de proteínas que podem ser expressas nesse sistema (Daly & Hearn, 2005).

Outra alternativa para sistemas de expressão é a utilização de células de insetos, pois são relativamente fáceis de manter, além de promoverem muitos dos processamentos pós-traducionais observados em células de mamíferos. O nível de produção obtido pode ser satisfatório, porém a manipulação e manutenção são mais complexas se comparadas às células de levedura e bactéria, que também são sistemas de cultivo mais baratos (Montor & Sogayar, 2003).

Nos sistemas de expressão baseados em células de mamíferos, as proteínas são processadas corretamente e são indistinguíveis das versões não-recombinantes, no entanto, apresentam algumas desvantagens: crescimento em meios caros, baixo nível de expressão e processo de purificação complexo (Shuler & Kargi, 2001).

Comparada à expressão em *E. coli*, a produção de proteínas heterólogas em leveduras permite um processamento mais similar ao encontrado em células animais, pois o ambiente intracelular da levedura é mais adequado para ocorrência de várias reações que normalmente acontecem em células de mamíferos. Porém, algumas modificações pós-traducionais realizadas em células animais não ocorrem nesses organismos, o que pode alterar a estrutura funcional da proteína. A expressão heteróloga em leveduras é bem caracterizada e há várias técnicas de manipulação gênica disponíveis, além de possuir a melhor relação

custo/benefício em eucariotos. É um sistema ideal para produção em larga escala de proteínas. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* são amplamente utilizadas como sistema de expressão heteróloga (Gellissen, 2000).

2.8. *Pichia pastoris*

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica, ou seja, pode crescer em metanol como única fonte de carbono. É um ascomiceto homotálico, que normalmente encontra-se haplóide no estado vegetativo e multiplica-se por brotamento multilateral, e pode ser manipulada por métodos genéticos clássicos (Cereghino & Cregg, 2000; Gellissen *et al.*, 2005).

A habilidade de certas espécies de levedura de utilizarem metanol como única fonte de carbono e energia foi descoberta há aproximadamente 40 anos (Ogata, 1969). Devido ao fato de que o metanol pode ser sintetizado a partir do gás natural metano, de forma relativamente barata, rapidamente as leveduras metilotróficas despertaram o interesse como fonte de proteína celular para ser utilizada primariamente como alimentação animal altamente protéica. Foi por este motivo que, no ano de 1970, a *Phillips Petroleum Company* desenvolveu meios e métodos para cultivo desta levedura, no intuito de transformá-la numa fonte de alimento animal, como *Single cell protein* - SCP (Wegner, 1990).

Após a crise do óleo, no mesmo período, o custo do metano aumentou dramaticamente, tornando inviável a produção de SCP por *P. pastoris*. Em 1980, a companhia de petróleo, junto ao *Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates Inc.* (SIBIA, La Jolla, CA, USA) decidiu transformar a levedura em um sistema de produção de proteínas recombinantes. No ano de 1993, a patente foi passada para a RCT (*Research Corporation Technology*- Tucson, AZ), e a *Invitrogen Corporation* (Carlsbad, CA, USA) foi licenciada

para vender o sistema de expressão na forma de kit (Cereghino & Cregg, 2000; Macauley-Patrick *et al*, 2005).

P. pastoris é uma das aproximadamente 30 espécies de levedura representadas em 2 gêneros diferentes (*Pichia* e *Candida*) capazes de metabolizar metanol (Kurtzman & Robnett, 1998). A via metabólica do metanol parece ser a mesma em todas as leveduras e envolve um único conjunto de vias enzimáticas. O primeiro passo no metabolismo do metanol é a oxidação do metanol a formaldeído, gerando peróxido de hidrogênio, pela ação da enzima álcool oxidase (AOX). Para evitar a toxicidade causada pelo peróxido de hidrogênio, esse primeiro passo ocorre dentro de uma organela celular especializada, chamada peroxissomo, que seqüestra o produto tóxico degradando-o em oxigênio e água (Cregg *et al.*, 2000).

Uma porção do formaldeído, gerado pela AOX, deixa o peroxissomo e é oxidada a formato e dióxido de carbono por duas desidrogenases citoplasmáticas, reações que são fonte de energia para o crescimento celular em metanol. O formaldeído que permanece no peroxissomo é utilizado como precursor de constituintes celulares. A AOX tem uma baixa afinidade por O₂, o que é compensado pela produção de grandes quantidades da enzima, chegando a mais de 30% das proteínas solúveis totais nas células cultivadas em metanol (Cereghino & Cregg, 2000; Gellissen *et al.*, 2005).

Existem dois genes que codificam a álcool oxidase em *P. pastoris*, AOX1 e AOX2, porém o AOX1 é responsável pela maioria da atividade da enzima álcool oxidase na célula. A expressão do gene AOX1 é fortemente regulada e induzida por metanol a altíssimos níveis. O controle da expressão é dado em nível transcricional (Cregg, 1989). No crescimento em metanol, cerca de 5% do RNA mensageiro é do AOX1. O promotor do gene AOX1 é fortemente reprimido em células cultivadas com glicose e outras fontes de carbono, mas é induzido mais de 1000 vezes quando são transferidas para meios contendo metanol como única fonte de carbono (Cereghino, 2002).

A regulação do gene *AOX1* parece envolver dois mecanismos: um de repressão/desrepressão e um mecanismo de indução, similar à regulação do gene *GAL1* em *S. cerevisiae*. A ausência de uma fonte de carbono repressora, tal como glicose no meio, não resulta em substancial transcrição do *AOX1*. A presença do metanol é essencial para induzir altos níveis de transcrição (Cregg *et al.*, 2000).

A capacidade de indução do promotor *AOX1* pelo metanol pode, portanto, ser usada para direcionar a expressão de proteínas recombinantes em altos níveis até mesmo com a integração de uma única cópia do cassete de expressão (Daly & Hearn, 2005). As vantagens e desvantagens em usar o promotor *AOX1* estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens do uso de sistemas com o promotor *AOX*.

Vantagens	Desvantagens
Transcrição da proteína de interesse é fortemente regulada e controlada por mecanismos de repressão/desrepressão	Monitoramento do metanol durante o processo é geralmente difícil
Altos níveis da proteína de interesse podem ser expressos, mesmo que elas sejam tóxicas para a célula	Metanol é inflamável; portanto, estoque de grandes quantidades requeridas pelo processo é indesejável
A repressão da transcrição pela fonte de carbono inicial assegura que bom crescimento celular é obtido antes do produto gênico ser superexpressado	Metanol é derivado de fontes petroquímicas, que pode ser inadequado para utilização na produção de determinados produtos alimentares e aditivos
Indução da transcrição é facilmente obtida pela adição de metanol	Duas fontes de carbono são necessárias, com uma mudança de uma para outra num momento preciso

Fonte: Macauley-Patrick *et al.*, 2005

Além do promotor *AOX1* existem outros alternativos que podem ser mais indicados para expressão de certos tipos de proteínas, são eles: *GAP*, *FLD1*, *PEX8*, *YPT1* e *PGK1*. Sistemas que utilizam vetores com o promotor *GAP* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) necessitam de glicose como fonte de carbono e são amplamente utilizados apresentando níveis de expressão semelhantes ou até maiores daqueles observados com o promotor *AOX1*

(Vassileva *et al.*, 2001), porém, por ser constitutivo, ele só é apropriado para proteínas recombinantes que não sejam tóxicas às células.

O promotor *FLD1* é originado do gene que codifica a enzima formaldeído desidrogenase que participa do metabolismo do metanol. Ele pode ser induzido por metanol, metilamina ou ambos, o que resulta em um alto nível de produção (Resina *et al.*, 2004).

O promotor *PGK1* tem origem no gene da enzima 3-fosfoglicerato quinase. Essa enzima participa tanto da via glicolítica (representando cerca de 30-60% do total de proteínas solúveis) como da via gliconeogênica. Por isso, devido aos altos níveis de expressão do gene *PGK1*, esse promotor tem sido isolado e usado na construção de vetores de expressão em várias leveduras e fungos filamentosos. Tal promotor tem mostrado altos níveis de expressão quando as células são crescidas em glicose quando comparadas com crescimentos em glicerol e metanol (Almeida *et al.*, 2005).

Já os promotores *YPT1*, induzido por manitol (Sears *et al.*, 1998) e construído a partir do gene da GTPase, e o *PEX8*, proteína da matriz peroxissomal (Liu *et al.*, 1995), não são muito utilizados, provavelmente pelos baixos níveis de expressão obtidos (Cregg *et al.*, 2000).

Existem linhagens de *Pichia* que têm o seu genótipo modificado para atender diferentes aplicações. Exemplos disto são as linhagens GS115 e KM71 que apresentam o gene da histidina desidrogenase (*his4*) inativo, funcionando assim, como uma marca de seleção para os transformantes (Daly & Hearn, 2004). Os fenótipos associados ao metabolismo do metanol variam em relação ao consumo lento ou normal da fonte de carbono, que depende da interrupção ou não do gene *AOX1*, respectivamente. Linhagens que apresentam o gene *AOX1* intacto (responsável por 85% da utilização do metanol) têm fenótipo *Mut⁺* (*Methanol utilization plus*) com taxa de crescimento no metanol igual ao tipo selvagem. A levedura que tem o fenótipo *Mut^s* (*Methanol utilization slow*) cresce e usa o metanol de maneira mais lenta

por apresentar o gene *AOX1* interrompido e assim, utilizar o *AOX2* que tem uma atividade menor no metabolismo metanólico (Inan & Meagher, 2001; Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

A expressão de qualquer gene de interesse em *P. pastoris* compreende três passos principais: (a) a inserção do gene em um vetor de expressão; (b) introdução do vetor de expressão na levedura *P. pastoris*; e (c) avaliação do potencial dos clones recombinantes para a expressão do gene de interesse (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

As técnicas requeridas para manipulação genética de *P. pastoris* são similares às descritas para *S. cerevisiae*. Transformação por eletroporação, métodos de geração de esferoplastos ou métodos de célula intacta, tais como os que envolvem cloreto de lítio e PEG (polietilenoglicol) podem ser utilizados sem maiores problemas. Como em *S. cerevisiae*, *P. pastoris* exibe uma tendência para recombinações homólogas entre seu genoma e DNAs artificialmente introduzidos. A clivagem de um vetor dentro de uma sequência compartilhada pelo genoma de *P. pastoris* estimula eventos de recombinação homóloga, ocorrendo eficiente integração por inserção do vetor no *locus* gênico alvo. Substituição gênica ocorre em uma frequência menor do que a observada em *S. cerevisiae* e requer sequências flanqueadoras longas para uma eficiente integração deste tipo (Cregg & Russell, 1998).

Os vetores de expressão gênica para uso com a levedura *P. pastoris* estão bem estabelecidos e têm sido utilizados com sucesso para produção de diferentes tipos de proteínas heterólogas (Higgins, 1995). A maioria dos vetores possuem um cassete de expressão composto pela sequência promotora do gene *AOX1* (*AOX1* 5'), um ou mais sítios de clonagem para inserção do gene heterólogo, uma sequência de término da transcrição do gene *AOX1*, sequências para integração no genoma e para secreção (Daly & Hearn, 2004). Além disso, os vetores devem conter também marcas de seleção. As marcas existentes são limitadas aos genes da via biossintética *HIS4* de *P. pastoris* e *S. cerevisiae*, e *ARG4* de *S. cerevisiae*, e o

gene *Sh ble* do *Streptoalloteichus hindustanus* o qual confere resistência à droga Zeocina[®], relacionada à bleomicina (Higgins *et al.*, 1998).

Outra propriedade dos muitos vetores de expressão é a presença de uma sequência sinal, que é alvo na via de secreção, fusionada à proteína recombinante. A sequência do peptídeo pré-pro do fator- α (sinal de secreção de *S. cerevisiae*) tem sido usada com sucesso em *P. pastoris*. A principal vantagem da secreção das proteínas heterólogas em *P. pastoris* é que naturalmente a levedura secreta níveis muito baixos de proteínas nativas (Cereghino & Cregg, 2000).

A transformação em *P. pastoris* ocorre pela integração do cassete de expressão em *locus* específico e origina transformantes geneticamente estáveis. Para que isso ocorra o cassete de expressão/vetor deve ser digerido em único sítio, que pode ser uma marca gênica (ex., *HIS4*) ou o promotor *AOX1*. A integração no genoma ocorre via recombinação homóloga quando o cassete de expressão/vetor contém regiões homólogas ao genoma da *P. pastoris*, e a integração pode ser via inserção ou substituição gênica (Romanos, 1995; Sreekrishna *et al.*, 1997).

A integração por inserção ocorre em alta frequência (50-80%) por eventos de *crossover* único nos *loci* *HIS4* ou *AOX1* (Cereghino & Cregg, 2000), e também pode resultar em integrações múltiplas em *tandem* devido a eventos de recombinação repetidos numa taxa de 1-10% dos transformantes (Daly & Hearn, 2005). A transformação de linhagens Mut⁺ com vetores linearizados na região 5' *AOX1* (P_{AOX1}) promovem a inserção por único *crossover* na região homóloga do locus *AOX1*, gerando transformantes Mut⁺, já que o gene *AOX1* não é interrompido. A transformação de linhagens Mut^s originam apenas transformantes Mut^s (Daly & Hearn, 2005).

Eventos de integração por substituição gênica ocorrem por duplo *crossover* no *locus* gênico alvo, dando origem a transformantes de cópia única que são geralmente mais estáveis.

A substituição gênica em *P. pastoris* é obtida pela digestão do vetor de expressão nas regiões 5' e 3' terminais que correspondem às regiões 5' e 3' do *locus AOX1*. A transformação resulta na deleção sítio-específica do gene *AOX1*, numa frequência de 5-25% dos transformantes (Daly & Hearn, 2005; Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Muitas vezes, é desejável selecionar transformantes que possuam várias cópias do cassete de integração, haja vista que tais clones potencialmente expressam níveis significativamente maiores da proteína recombinante. Múltiplos eventos de integração são relativamente raros, ocorrendo a uma taxa de 1-10% (Chen *et al.*, 2000b). O número de cópias integradas do cassete de expressão pode afetar a quantidade de proteína expressa. Por exemplo, o aumento do número de integrações do cassete de expressão de 1 para 14 para o fragmento C da toxina tetânica aumentou em 6 vezes os níveis de expressão (Clare *et al.*, 1991). Do mesmo modo, 20 cópias integradas do fator de necrose tumoral (TNF- α) resultaram em um aumento de 200 vezes nos níveis da proteína (Sreekrishna *et al.*, 1989).

Uma maneira sensível de detectar múltiplos eventos de integração é a utilização de vetores seletivos que contêm o gene *Sh ble*, que confere resistência à zeocina. Resistência a elevadas concentrações de zeocina permite que clones com múltiplas integrações possam ser selecionados, pois o produto do gene *Sb ble* liga-se e, por consequência, inativa a zeocina de forma dose-dependente (Vassileva *et al.*, 2001).

O sistema de expressão baseado nas células de *P. pastoris* apresenta características peculiares que exercem muitas vantagens sobre outros sistemas. Contudo, a maior vantagem de *P. pastoris* sobre sistemas de expressão em bactérias é o potencial para fazer muitas modificações pós-traducionais tipicamente associadas a eucariotos superiores, como processamento de seqüências sinais, conformação, formação de pontes dissulfeto, certos tipos de adição de lipídios, e glicosilações, modificações necessárias para atividade biológica das proteínas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Além disso, esta levedura tem um padrão de

glicosilação similar ao das células animais e não promove hiperglicosilação como a *S. cerevisiae* (Cereghino *et al*, 2002; Torres & Moraes, 2002).

Há dois tipos de glicosilação: a nitrogênio-glicosilação, que ocorre no nitrogênio da amina de cadeias laterais de asparagina e a oxigênio-glicosilação, que ocorre no oxigênio da hidroxila de serina e treonina. Em mamíferos, oxigênio-glicosilação são compostas de uma variedade de açúcares, incluindo N-acetilgalactosamina, galactose e ácido siálico. Entretanto, eucariotos inferiores, tais como *P. Pastoris*, fazem oxigênio-glicosilação apenas com resíduos de manose (Gellissen, 2000).

As nitrogênio-glicosilações em eucariotos ocorrem com a transferência de uma unidade oligossacarídica ligada a um lipídio para uma asparagina no sítio de reconhecimento Asn-X-Ser/Thr. Tanto *P. pastoris* como *S. cerevisiae* têm a maioria das nitrogênio-glicosilações do tipo *high* manose. No entanto, *P. pastoris* apresenta vantagens na glicosilação de proteínas secretadas porque não faz hiperglicosilações. O tamanho das cadeias de oligossacarídeos adicionadas pela *P. pastoris* (em média 8-14 resíduos de manose) é muito menor do que as de *S. cerevisiae* (50-150 resíduos de manose). Além disso, oligossacarídeos de *P. pastoris* não apresentam glicosilações nas posições α -1,3. Essas ligações tornam muitas proteínas recombinantes produzidas em leveduras inviáveis para uso farmacêutico, uma vez que são hiper-antigênicas (Cereghino & Cregg, 2000; Daly & Hearn, 2005).

A fermentação com *Pichia* pode ser feita facilmente em larga escala para atender a demandas maiores, e os parâmetros que influenciam a produção e atividade da proteína, como pH, aeração e quantidade de carbono podem ser bem controlados (Higgins & Cregg, 1998). Além disso, esta levedura não é uma forte fermentadora, como *S. cerevisiae* e conseqüentemente não atinge com rapidez níveis de etanol e ácido acético tóxicos para as células (Cereghino *et al*, 2002).

Durante os últimos anos, o número de publicações científicas detalhando o uso de *Pichia pastoris* tem crescido rapidamente. Isso acarretou em uma significativa demanda desse sistema para a produção industrial de proteínas heterólogas, substituindo os métodos mais convencionais, como por exemplo, a produção em *E. coli* e *S. cerevisiae* (Macauley-Patrick *et al.* 2005). O sistema de expressão em *P. pastoris* tem sido amplamente utilizado para produção de uma variedade de proteínas heterólogas de diversos organismos, entre eles vírus, bactérias, fungos, protistas, plantas e animais, incluindo o homem. Entre essas proteínas destacam-se as usadas para produção de subunidades vacinais contra viroses, tais como antígeno de superfície do vírus da hepatite B (Cregg *et al.*, 1987), a proteína estrutural do vírus dengue (Sugrue *et al.*, 1997) e a glicoproteína D do herpes vírus bovino (Zhu *et al.*, 1997).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires KA, Cianciarullo AM, Carneiro SM, Villa LL, Boccardo E, Perez-Martinez G, Perez-Arellano I, Oliveira ML e Ho PL (2006) Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells, Appl. Environ. Microbiol. 72: 745–752.
- Almeida JR, Moraes LM, Torres FA (2005) Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Yeast 22(9):725-37.
- Araibi EH, Marchetti B, Dornan ES, Ashrafi GH, Dobromylskyj M, Ellis SA e Campo MS (2006) The E5 oncoprotein of BPV-4 does not interfere with the biosynthetic pathway of non-classical MHC class I. Virology 353:174–183.
- Ashrafi GH, Tsirimonaki E, Marchetti B, O'Brien PM, Sibbet GJ, Andrew L e Campo MS (2002) Downregulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. Oncogene 21: 248-259.
- Barr E & Tamms G (2007) Quadrivalent human papillomavirus vaccine. Clin Infect Dis. 45(5):609-7.
- Baxter MK, McPhillips MG, Ozato K, McBride AA (2005) The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein Brd4. J. Virol. 79: 4806-4818.
- Bernard HU (2005) The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. Journal of Clinical Virology 32S: S1–S6.
- Booy FP, Roden RB, Greenstone HL, Schiller JT e Trus BL (1998) Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 Å resolution. J. Mol. Biol. 281: 95-106.

- Borzacchiello G, Ambrosio V, Roberto S, Poggiali F, Tsirimonakis E, Venuti A, Campo MS e Roberto F (2003) Bovine Papillomavirus Type 4 in Oesophageal Papillomas of Cattle from the South of Italy. *J. Comp. Path.* 128: 203-206.
- Borzacchiello G e Roberto F (2008) Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet. Res.* 39: 45.
- Borzacchiello G, Russo V, Gentile F et al. (2006) Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet-derived growth factor [beta] receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. *Oncogene* 25: 1251–60.
- Breitbart F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trin-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT e Lowy DR (1995) Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 69: 3959-3963.
- Buch CB, Thompson CD, Pang YS, Lowy DR e Schiller JT (2005) Maturation of Papillomavirus Capsids. *J Virol* 79:2839-2846.
- Butel J (2000) Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 21:405-426.
- Campo MS (1997a) Bovine papillomavirus and cancer. *Vet J* 154: 175-/188.
- Campo MS (1997b) Vaccination against papillomavirus in cattle. *Clin Dermatol* 15:75-283.
- Campo MS (1998) Persistent infection by bovine papillomavirus. In: Ahmed, R., Chen, I.S.Y. *Persistent Viral Infections*. Wiley, pp. 503-516.
- Campo MS (2002) Animal models of Papillomavirus Pathogenesis. *Virus Research* 89:249-261.
- Campo MS (2003) Papillomavírus and disease in humans and animals. *Vet Comp Oncol* 1: 3-14.

- Campo MS (2006) Bovine papillomavirus: old system, new lessons? In: Campo, M.S. (eds) Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond. Caister Academic Press, Wymondham, England, Chap 23.
- Campo MS, Jarrett WFH, Barron R, O'Neil BW e Smith KT (1992) Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. Cancer Res. 52: 6898-6904.
- Campo MS, O'Neil BW, Barron RJ e Jarrett WFH (1994) Experimental reproduction of the papilloma -/carcinoma complex of the alimentary canal in cattle. Carcinogenesis 15: 1597-1601.
- Carvalho C, Freitas AC, Brunner O, Góes LGB, Yagui-Cavalcante A, Beçak W e Stocco dos Santos RC (2003) Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine female. Braz J Microbiol 34: 72-73.
- Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C e Cregg JM (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Curr Opin Biotech 13:329-332.
- Cereghino JL & Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiology 24: 45-66.
- Chambers G, Ellsmore VA, O'Brien PM, Reid SW, Love S, Campo MS e Nasir L (2003) Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. J. Gen. Virol. 84:1055-62.
- Chen XS, Garcea RL, Goldberg I, Casini G e Harrison SC (2000a) Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. Mol Cell 5(3):557-67.

- Chen YS, Jin M, Egborge T, Coppola G, Andre J e Calhoun DH (2000b) Expression and characterization of glycosylated and catalytically active recombinant human alpha-galactosidase a produced in *Pichia pastoris*. Protein Express. Purif. 20: 472–484.
- Clare JJ, Rayment FB, Ballantine SP, Sreekrishna K e Romanos MA (1991) High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. BioTechnology 9: 455–460.
- Cregg JM (1989) Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. Mol. Cel Biol. 9: 1316-1323.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J e Higgins DR (2000) Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. Mol Biotechnol 16:23-52.
- Cregg JM & Russell KA (1998) Transformation. Methods Mol Biol 103: 27-39.
- Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, Siegel R, Akong M, Craig WS, Buckholz RG, Madden KR, Kellaris PA, Davis GR, Smiley BL, Cruze J, Torregrossa R, Velicelebi G e Thill GP (1987) High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. Bio/Technology 5:479-485.
- Confer, AW & Panciera, RJ (2001) The urinary system. In Thomson's Special Veterinay Pathology, 3^a ed. Pag. 235-77. Editora WW Carlton & JF Zachary. St Louis, Missori: Mosby.
- Corrêa WM & Corrêa CNM (1992) Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos: Papilomatoses. Rio de Janeiro, Medsi, 843p. 2.ed.
- Daly R & Hearn MTW (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. J. Mol. Recognit. 18: 119–138.

- 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.
- de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U e zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C e Crawford L (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352:824-7.
- Dupuy C, Buzoni-Gatel D, Touzé A, Bout D e Coursaget P (1999) Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes. *J. Virol.* 73(11):9063-71.
- Frazer IH (1996) Immunology of papillomavirus infection. *Curr Opin Immunol* 8:484-491.
- Freitas AC, Silva MAR, Carvalho CCR, Birgel Jr EH, Santos JF, Beçak W e Stocco dos Santos RC (2007) Papillomavirus DNA detection in non epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus. *Communicating Current research and educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.
- Freitas AC; Carvalho C, Brunner O, Birgel Jr. EH, Libera AMD, Benesi FJ, Beçak W e Stocco dos Santos RC (2003) Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the vírus: a discussion about BPV-1. *Braz J Microbiol* 34: 76-78.
- Gaukroger J, Chandrachud L, Jarrett WFH, McGarvie GE, Yeudall WA, McCaffery RE, Smith KT e Campo MS (1991) Malignant transformation of a papilloma induced by bovine papillomavirus type 4 in the nude mouse renal capsule. *J Gen Virol* 72:1165-1168.

- Gellissen G (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 741–750.
- Gellissen G, Kunze G , Gaillardin C, Cregg JM, Berardi E, Veenhuis M e van der Klei I (2005) New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* – A comparison. *FEMS Yeast Research* 5: 1079–1096.
- Goldschmidt MH & Hendrick MJ (2002) Equine sarcoid. In: *Tumours in Domestic Animals*, 4th edition, pp 88–89. Iowa: Iowa State University Press.
- Goldstein DJ, Finbow ME, Andresson T et al. (1991) Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16K component of vacuolar H (+)-ATPases. *Nature* 352: 347–9.
- Han R, Reed CA, Cladel NM e Christensen ND (1999) Intramuscular injection of plasmid DNA encoding cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6 and E7 induces T cell-mediated but not humoral immune responses in rabbits. *Vaccine* 17:1558-1566.
- Hatama S, Nobumoto K e Kanno T (2008) Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *J Gen Virology* 89: 158–163.
- Higgins DR (1995) *Current Protocols in Protein Science: Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. P T Wingfield 1.ed (2) p571-5716.
- Higgins DR, Busser K, Comiskey J, Whittier PS, Purcell TJ e Hoeffler JP (1998) Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection. *Methods Mol Biol* 103: 41-53.
- Higgins DR & Cregg JM (1998) *Pichia Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Howley PM & Lowy DR (2001) Papillomaviruses and their replication, p. 2197–2229. In P. M. Howley e D. M. Knipe (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.

- Hu J, Han R, Cladel NM, Pickel MD e Christensen ND (2002) Intracutaneous DNA Vaccination with the E8 Gene of Cottontail Rabbit Papillomavirus Induces Protective Immunity against Virus Challenge in Rabbits. J Virol 76:6453-6459.
- Inan M & Meagher MM (2001) The effect of ethanol and acetate on protein expression. J Biosci Bioeng 92:337-341.
- Invitrogen (2007) Easysselect™ Pichia Expression Kit – A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZα in *Pichia pastoris*. Disponível em: <www.invitrogen.com>.
- Jackson ME & Campo MS (1995) Both viral E2 protein and the cellular factor PEBP2 regulate transcription via E2 consensus sites within the bovine papillomavirus type 4 long control region, J. Virol. 10: 6038-6046.
- Jackson ME, Campo MS e Gaurroger J (1993) Cooperation between papillomavírus and chemical cofactors in oncogenesis. Crit Rev Oncog 4: 277-291.
- Jarrett WFH, Campo MS e O'Neil BW (1984) A novel bovine papillomavirus (BPV-6) causing true epithelial papillomas of the mammary gland skin: a member of a proposed new subgroup. Virology 136:256-64.
- Jarrett WFH, O'Neil BW, Gaukroger JM, Laird HM, Smith KT e Campo MS (1990) Studies on vaccination against papillomaviruses: a comparison of purified virus, tumour extract and transformed cells in prophylactic vaccination. Vet. Rec. 126: 449-452.
- Jelínek F & Tachezy R (2005) Cutaneous Papillomatosis in Cattle. J Comp Path 132:70-81.
- Kanodia S, Fahey LM e Kast WM (2007) Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. Curr Cancer Drug Targets 7(1):79-89.
- Kirnbauer R (1996) Papillomavirus-like particles for serology and vaccine development. Intervirology 39:54-61.

- Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR e Schiller JT (1992) Papillomavirus L1major capsid protein selfassembles into virus-like particles that are highly immunogenic. Proc Natl Acad Sci USA 89:12180–12184.
- Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, Wagner ER, Grindlay GJ, Armstrong A, McGarvie GM, Schiller JT, Lowy DR e Campo MS (1996) Vírus-like particles of bovine papillomavírus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. Virology 219: 37- 44.
- Konya J & Dillner J (2001) Immunity to oncogenic human papillomaviruses. Adv. Cancer Res. 82: 205-238.
- Kurtzman CP & Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331–371.
- Lambert PF (1991) Papillomavirus DNA replication. Journal of Virology 65: 3417-3420.
- Leal AM, Ferraz OP, Carvalho C, Freitas AC, Beniston RG, Beçak W, Campo MS e Stocco dos Santos RC (2003). Quercetin induces structural chromosome aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4. Veterinary Comparative Pathology 1:15-21.
- Liljeqvist S & Stahl S (1999) Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. J Biotechnol 73:1-33.
- Liu H, Tan X, Russell KA, Veenhuis M e Cregg JM (1995) PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a peroxisomal membrane protein involved in protein import. J Biol Chem 270(18):10 940.
- Lowy DR & Sciller JT (2006) Prophylactic human papillomavirus vaccines. J Clin Invest 116(5):1167-73.

- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B e Harvey LM (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249–270.
- Marchetti B, Ashrafi GH, Tsirimonaki E, O'Brien PM e Campo MS (2002) The papillomavirus oncoprotein E5 retains the major histocompatibility class I in the Golgi apparatus and prevents its transposition to the cell surface. *Oncogene* 21:7808-7816.
- McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ e Hilleman MR (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307: 178–180.
- McCance DJ (2005) Transcriptional regulation by human papillomaviruses. *Curr Opin in genetics & development* 15:515-519.
- Melo CB & Leite RC (2003) Papilomatose Bovina. *Ciênc. Vet. Tróp.* 6(1): 1-12.
- Modis Y, Trus BL e Harrison SC (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal* 21 (18): 4754-4762.
- Montor WR & Sogayar MC (2003). Insetos como biofábricas de proteínas humanas. *Ciência Hoje* 33(196):16-23.
- Morton CL & Potter PM (2000) Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda*, and COS7 cells for recombinant gene expression. Application to a rabbit liver carboxylesterase. *Mol biotechnol* 16: 193-202.
- Moura JW, Stocco dos Santos RC, Dagli MLZ, D'Angelino JL, Birgel EH e Becak W (1988) Chromosome aberrations in cattle raised on bracken fern pasture. *Experientia* 44: 785-788.
- Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M e Zacny VL (2001) Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20(54): 7888-98.
- Munger K & Howley PM (2002) Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89:213-228.

- Munoz N (2000) Human papillomavírus and câncer: the epidemiological evidence. J Clin Virol 19: 1-5.
- Nasir L & Campo MS (2008). Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. Vet Dermatol. 19(5):243-54.
- Nasir L & Reid SWJ (1999) Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. Virus Res. 61 (2): 171-175.
- Nicholls PK & Stanley MA (2000) The immunology of animal papillomaviruses. Vet Immunol Immunopathol 73:101-127.
- O'Brien & Campo MS (2002) Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. Virus Research 88(1-2):103-17.
- Ogata, K., Nishikawa, H. e Ohsugi, M. (1969) A yeast capable of utilizing methanol. Agric. Biol. Chem. 33: 1519-1520.
- Ogawa T, Tomita Y, Okada M, Shinozaki K, Kubonoya H, Kaiho I e Shirasawa H (2004) Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. J Gen Virology 85:2191-2197.
- Ogawa T, Tomita Y, Okada M e Shirasawa H (2007) Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. J Gen Virol 88:1934-1938.
- Orth G, Favre M e Croissant O (1977) Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. J. Virol. 24: 108–120.
- Palker TJ, Monteiro JM, Martin MM, Kakareka C, Smith JF, Cook JC, Joyce JG e Jansen KU (2001) Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles. Vaccine 19(27):3733-43.
- Resina D, Serrano A, Valero F e Ferrer P (2004) Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. J Biotechnol 109(1–2):103–113.

- Roden RB, Greenstone HL, Kirnbauer R, Booy FP, Jessie J, Lowy DR e Schiller JT (1996) In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. J Virol 70: 5875-5883.
- Roden RB, Weissinger EM, Henderson DW, Booy F, Kirnbauer R, Mushinski JF, Lowy DR e Schiller JT (1994) Neutralization of bovine papillomavirus by antibodies to L1 and L2 capsid proteins. J. Virol. 68: 7570-7574.
- Roden R & Wu TC (2006) How will HPV vaccines affect cervical cancer? Nature Reviews Cancer 6:753-763.
- Romanos M (1995) Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. Current Opinion in Biotechnology 6:527-533.
- Schiller JT & Lowy DR (2001) Papillomavirus-like particle based vaccines: cervical cancer and beyond. Expert Opin. Biol. Ther. 1(4): 571-81.
- Sears IB, Oconnor J, Rossanese OW e Glick BS (1998) A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. Yeast 14:783–790.
- Shuler ML & Kargi F (2001) Utilizing Genetically Engineered Organisms In: Bioprocess Engineering: Basic Concepts, 2nd Edition by Prentice Hall.
- Silva AMT, Amaral MVT e Cruz AD (2003) HPV e Câncer: O papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. Biotecnol Ciênc Desenvol 29:48-54.
- Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A e Birkenberger LA (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gene 190: 55-62.
- Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R, Cruze J, Mazzaferro P, Fish W, Fuke M, Holden K, Phelps D et al. (1989) High-level expression purification and characterization of

- recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia-pastoris*. *Biochemistry* 28: 4117–4125.
- Stocco dos Santos RC, Lindsey CJ, Ferraz O, Pinto JR, Mirandola RS, Benesi FJ, Birgel EH, Bragança Pereira CA e Beçak W (1998) Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: a experimental model. *J Gen Virol* 79: 2127-2135.
- Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L e Crawford L (1988) Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types. *Embo J* 7:1815-1820.
- Strasser AWM & Gellissen G (1998) Yeast expression systems and their competitive environment. *Pharm. Manuf. Int.* 3: 151-152.
- Stubenrauch F & Laimins LA (1999) Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Cancer Biology* 9:379-386.
- Sugrue RJ, Fu J, Howe J e Chan YC (1997) Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 78:1861-1866.
- Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, Newsome JA, Jenson AB e Schlegel R (1995) Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11553-11557.
- Tindle, RW (1996) Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 643-650.
- Tomita Y, Literak I, Ogawa T, Jin Z e Shirasawa H (2007) Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a European bison. *Virus Genes* 35:243–249.
- Torres FAG & Moraes LMP (2002) Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. *Biotechnol Cienc Desenvol* 29: 20-22.

- Torrontegui BO and Reid SJ (1994) Clinical and pathological epidemiology of the equine sarcoid in a referral population. *Equine Vet Educ* 6, 85–88.
- Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S e Khanna N (2001) Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 21:71-80.
- Vousden K (1993) Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *The FASEB Journal* 7:872-879.
- Wegner, G. (1990) Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 7: 279-283.
- Werness BA, Levine AJ e Howley PM (1990) Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248:76-79.
- 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.
- Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ e Frazer IH (1991) Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 185: 251–257.
- Zhu X, Wu S e Letchworth GJ (1997) Yeast-secreted bovine herpesvirus type 1 glycoprotein D has authentic conformational structure and immunogenicity. *Vaccine* 15: 679-688.
- Zimmermann H, Koh CH, Degenkolbe R, O'Connor MJ, Muller A, Steger G, Chen JJ, Lui Y, Androphy E e Bernard HU (2000) Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J Gen Virol.* 81: 2617-2623.
- zur Hausen H (1998) Papillomavirus and p53. *Nature* 393:217.
- zur Hausen, H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342-350.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o uso do sistema de expressão heteróloga baseado em células da levedura *Pichia pastoris* para a produção da proteína L1 do capsídeo do papilomavírus bovino tipo 1.

4.2. Objetivos Específicos

1. Construir o vetor de expressão pPICZL1B1;
2. Transformar células da levedura *P. pastoris* com a construção pPICZL1B1;
3. Selecionar e analisar os clones recombinantes de levedura;
4. Avaliar a produção da proteína L1 de BPV 1.

5. MANUSCRITO DE ARTIGO CIENTÍFICO

Produção da proteína L1 do Papilomavírus bovino tipo 1 em *Pichia pastoris*

Manuscrito a ser encaminhado à revista

Genetics and Molecular Biology

ISSN 1415-4757

SP, Brasil

Produção da proteína L1 do Papilomavírus bovino tipo 1 em *Pichia pastoris*

**André Luiz Santos de Jesus^{1,2}, Helder Melo de Souza^{1,2}, Eliane Campos Coimbra^{1,2},
Júlia Furtado Campos^{1,2}, Antonio Carlos de Freitas^{1,2}.**

¹Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Setor de Biologia Molecular, Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami, Universidade
Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Autor para correspondência:

Antonio Carlos de Freitas

Av. Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

FAX: 00558121268522

E-mail: acf_ufpe@yahoo.com.br

Resumo

Os papilomavírus constituem um grupo de pequenos vírus de DNA de dupla fita caracterizados por induzirem a formação de lesões que são em geral benignas, podendo regredir naturalmente ou se transformar em tumores malignos. Dentre eles se encontra o papilomavírus bovino (BPV). No momento não há tratamento com eficácia comprovada. A proteção contra infecção é conferida por anticorpos neutralizantes direcionados proteína estrutural L1. Estes anticorpos podem ser eficientemente induzidos por imunização com *virus-like particles* (VLP), que se formam espontaneamente após a expressão de L1 em vetores recombinantes. A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* emergiu como um sistema de expressão heterólogo, eficiente e de baixo custo para a produção de proteínas. Neste trabalho foi avaliada a produção da proteína L1 de BPV-1 por células de *P. pastoris*. O gene L1 foi amplificado e clonado no vetor de expressão pPICZA, sob o controle do promotor induzível *AOX1*. As células de *P. pastoris* foram transformadas com pPICZAL1B1 e os recombinantes de *P. pastoris* obtidos foram analisados para expressão do gene L1 por RT-PCR e Dot blot. Os transformantes analisados mostraram transcrição do gene e conseqüente produção da proteína L1 de BPV 1.

Introdução

Papilomavírus é um grupo muito heterogêneo de vírus, e diferentes tipos são associados com lesões epiteliais específicas. São pequenos vírus com capsídeo icosaédrico, não-envelopado, com 52-55 nm de diâmetro, possuindo DNA de fita dupla circular, com cerca de 8 Kb onde a informação genética está distribuída em pelo menos oito ORFs (*Open Reading Frame*). Os genes de expressão precoce (E, do inglês *Early*) codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA, na transcrição e no processo de transformação celular. Os

genes de expressão tardia (L, do inglês *Late*) codificam as proteínas L1 e L2 que formam o capsídeo viral (zur Hausen, 2002; de Villiers *et al.*, 2004).

O papilomavírus bovino (BPV) é o agente etiológico do câncer do trato digestório superior, do câncer de bexiga urinária (relacionado à hematúria enzoótica) e pela papilomatose cutânea. Até o momento dez tipos de BPVs foram identificados, estando estes relacionados com fibropapilomas cutâneos, papilomas escamosos da pele e esôfago e carcinomas (Borzacchiello and Roperto, 2008).

A papilomatose bovina é uma doença importante economicamente por causar desvalorização dos animais a serem comercializados, piorando a aparência e causando depreciação do couro dos animais afetados (Mello and Leite, 2003). Infecções bacterianas secundárias podem resultar em perda de condição corporal. Interferências na lactação e no coito também são relatadas, devido à obstrução física. A mastite devido à infecção ascendente e o trauma de papilomas múltiplos na base da teta foram relatados como possíveis causas de perda produtiva nos animais. Além da papilomatose, o gado pode apresentar processos neoplásicos derivados da malignização de papilomas pré-existentes, devido à ação sinérgica de co-fatores ambientais, que também debilitam os animais e podem evoluir para óbito (Campo, 2002; Leal *et al.*, 2003).

Os bovinos apresentam uma resposta imune pobre contra os BPVs, o que contribui para persistência da infecção, até mesmo em animais imunocompetentes. A dificuldade de o sistema imune reconhecer o vírus é devida ao fato do seu ciclo de infecção ser restrito ao epitélio e não existir contato com o sistema imune do hospedeiro (O'Brien and Campo, 2002). No entanto, uma resposta imune imediata e prolongada pode ser provocada quando bovinos são imunizados com proteínas do BPV (Campo, 2006).

Os papilomavírus não podem ser cultivados em laboratório como fonte para produção de antígenos usados para testes sorológicos e para o desenvolvimento de vacinas

convencionais de vírus mortos (Da Silva *et al.*, 2001). Portanto, as vacinas contra papilomavírus atualmente em desenvolvimento empregam tecnologia da engenharia genética. A proteína L1, a principal proteína do capsídeo de papilomavírus, quando produzida em células eucarióticas, é capaz de se organizar como VIPs (*virus-like particles*), estruturas capazes de preservar características estruturais e imunogênicas como um vírus intacto (Zhou *et al.*, 1993; Kirnbauer *et al.*, 1996). Elas apresentam os epítomos conformacionais necessários para indução de altos títulos de anticorpos neutralizantes e não são infecciosas ou oncogênicas, pois não possuem o genoma viral, o que as tornam atraentes candidatas para o desenvolvimento de vacinas profiláticas (Stanley, 2005).

Como um sistema de expressão, as leveduras oferecem algumas vantagens distintas sobre outros sistemas de expressão, tanto em termos de capacidade de produção em alta escala e produtividade, bem como a segurança comprovada de proteínas recombinantes produzidas em leveduras para aplicações farmacêuticas (Morton and Potter, 2000). A expressão das proteínas do capsídeo dos papilomavírus tem sido relatada em diversos sistemas de expressão heteróloga como bactérias, células de inseto, mamífero e leveduras (Ghim *et al.*, 1996; Kirnbauer *et al.*, 1996; Barr and Tamms, 2007).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* apresenta características peculiares que exercem muitas vantagens sobre outros sistemas (Cereghino and Cregg, 2000; Macauley-Patrick *et al.*, 2005), tais como a simplicidade das técnicas necessárias para sua manipulação genética, a capacidade de *P. pastoris* para a produzir proteínas heterólogas em altos níveis (forte promotor do gene da álcool oxidase, AOX, que é fortemente regulada e induzida por metanol), a capacidade de realizar muitas modificações pós-traducionais tipicamente associadas a eucariotos superiores, e a disponibilidade comercial desse sistema de expressão (Liu *et al.*, 2004). Além disso, esta levedura, ao contrário de *Saccharomyces cerevisiae*, é capaz de expressar glicoproteínas que não são hiperglicosiladas, que é uma característica

indesejável que limitam as potenciais aplicações farmacêuticas de proteínas recombinantes (Cereghino and Cregg, 2000).

Este trabalho teve como objetivo a expressão do gene L1 de BPV 1 em células da levedura *P. pastoris* como base para o desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra a infecção por BPV.

Materiais e Métodos

Linhagens e Plasmídeos

A linhagem de *Pichia pastoris* usada nesse estudo para a expressão da proteína L1 de BPV 1 foi a X-33 (genótipo selvagem e fenótipo - Mut⁺ e His⁺), adquirida da Invitrogen (Carlsbad, CA,USA).

O plasmídeo pAT153 contendo o genoma completo de BPV 1 foi usado para obter o gene L1 de BPV 1. O vetor pGEM-T *Easy* (Promega, Madison, USA) foi utilizado para clonagem de produtos de PCR. O vetor pPICZA (Invitrogen), contendo o promotor AOX1, a região de terminação de transcrição AOX1TT e o gene *Sh ble*, que dá resistência ao antimicrobiano Zeocina foi usado para a expressão da proteína L1 em *P. pastoris*.

Todos os passos de clonagem foram realizados utilizando *Escherichia coli* Top 10 (Invitrogen).

Geração do Vetor de Expressão

O gene L1 foi amplificado por PCR a partir do genoma viral completo de BPV-1 clonado em pAT153, usando a DNA polimerase *Platinum High Fidelity* (Invitrogen). *Primers* específicos foram construídos com base nas seqüências depositadas no Gene Bank (NC_001522). O *primer forward* L1B1 5'- GAATTCAWAATGTCCTTTGTGGCAACA -3', o sítio de *EcoRI* está sublinhado e a seqüência consenso Kozak para levedura está em itálico). O *primer reverse* L1B1 5'- CTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTGCAGGC -3', possui um sítio de

restrição para *XhoI* (sublinhado). O códon de terminação do gene L1 foi removido no intuito de manter a matriz de leitura com a cauda de poli-histidina do vetor pPICZA, que foi usada na imunodetecção da proteína. O gene L1 amplificado foi inicialmente clonado no vetor pGEM-T *Easy*, originando a construção pGEML1B1. Após a digestão de pGEML1B1, com as enzimas *EcoRI* e *XhoI*, o fragmento contendo L1 foi purificado e sub-clonado no vetor de expressão pPICZA, igualmente digerido com as mesmas enzimas, gerando a construção pPICZAL1B1.

Transformação de *Pichia pastoris*

Inicialmente, a construção pPICZAL1B1 e o vetor pPICZA foram linearizados com a enzima *SacI*. Em seguida, células da levedura *P. pastoris* X-33 eletrocompetentes (80 µl) preparadas de um crescimento em fase *log* foram misturados a 10 µg do plasmídeo previamente linearizado (em 10 µl de água), transferidos para uma cubeta de eletroporação de 2 mm gelada e incubados no gelo por cinco minutos. A eletroporação foi realizado a 1500 V por 5 ms. Imediatamente após, foram adicionados 1 ml de sorbitol 1M e as células incubadas por duas horas a 30°C. Após a incubação, 100 µl de células foram plaqueados em meio YPDS (YPD + Sorbitol 1M) com 100 µg/ml de zeocina. As placas foram incubadas por três dias a 30°C e os transformantes analisados.

Análise dos Recombinantes de *Pichia pastoris*

Os recombinantes, obtidos pela seleção por zeocina, foram analisados quanto à presença do cassete de expressão por PCR de colônia, como descrito por Linder e colaboradores (1996). Resumidamente, uma colônia isolada foi coletada e ressuspensa em 20 µl de água. Em seguida, foi adicionada 5 µl de uma solução de litase 5 U/µl e incubada a 30°C por dez minutos. Logo após, a amostra foi congelada a -80°C durante dez minutos e uma alíquota da suspensão foi utilizada com DNA *template* numa reação de PCR (50 µl

volume final). Para amplificação foram usados o *primer* AOX1F 5'- GACTGGTTCCAATTGA CAAGC -3' e o *primer* AOX1R 5'- GCAAATGGCATTCTGACATCC -3'.

Cultivo e Indução dos Recombinantes

Os transformantes selecionados foram inoculados em 50 ml de meio BMGY (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1.34% YNB, 0.002% biotina, 1% glicerol, 100 mM fosfato de sódio, pH 6.0) e incubados a 28°C por 48 h sob agitação vigorosa (240 rpm). Para indução da expressão de L1, as células foram centrifugadas e transferidas para 50 mL de meio BMMY (composição similar ao BMGY, exceto pela substituição do glicerol por metanol 0,5%). A cultura foi mantida a 28°C sob agitação (240 rpm) durante quatro dias. A indução foi realizada a cada 24 horas com adição de metanol 100% para uma concentração final de 2%, até completar 96 horas de indução.

Análise de RNAm dos Recombinantes de *P. pastoris*

O RNA total foi extraído das amostras dos recombinantes X-33/pPICZAL1B1 em 96 h de indução com metanol com o kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. O RNAm de L1 foi detectado por RT-PCR, usando o kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega). O produto da amplificação do RT-PCR foi gerado com os *primers*: FwRTL1B1 5'- AATCAGATCTACCTCTTGACATTC -3' e RevRTL1B1 5'- CACAGAGCATAGCTCTAATATAAAG -3'.

Análise da Produção da Proteína L1

Após as 96 horas de indução, as células foram centrifugadas e lisadas. Para a lise adicionou-se 100 µl de tampão de lise (50 mM de fosfato de sódio, 1 mM de PMSF, 1 mM EDTA e 5% de glicerol) e *glass beads* (0,5 mm), em seguida foram realizados 8 ciclos de 30 segundos no vórtex e 30 segundos no gelo. Após centrifugação, o sobrenadante foi recuperado para análise da proteína L1. O extrato protéico solúvel foi então purificado por coluna de níquel com o *Ni-NTA Spin Kit* (Qiagen, Germany) e o material purificado foi

submetido a uma diálise e liofilização para realização de um Dot Blot. Para análise de Dot Blot, as proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e a imunodeteção realizada com um anticorpo primário anti-His conjugado a fosfatase alcalina (Sigma) na diluição 1:20.000 e com um anticorpo monoclonal anti-L1 (CamVir1) (McLean *et al.*, 1990) na diluição 1:1.000 seguido por anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina.

Resultados

O gene L1 foi amplificado por PCR do genoma completo de BPV 1 usando os *primers* descritos em Materiais e Métodos. O fragmento foi clonado no vetor pGEM-T *Easy* e subclonado no vetor de expressão pPICZA, gerando a construção pPICZAL1B1 (Figura 1).

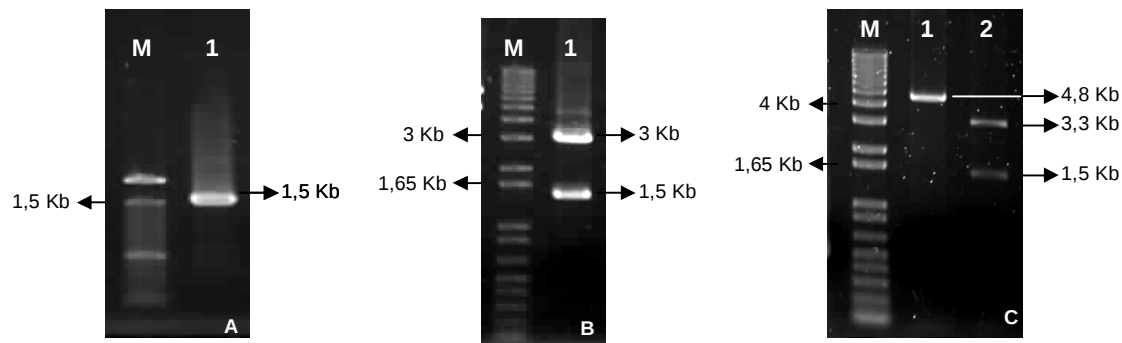


Figura 1. Construção do Vetor de Expressão pPICZAL1B1. **(A)** Amplificação do gene L1 de BPV 1: M- marcador molecular 100 pb, 1- fragmento da PCR de 1,5 Kb correspondente ao gene L1 de BPV 1; **(B)** Construção pGEM-L1B1: M- marcador molecular 1 Kb plus, 1- Digestão da construção pGEM-L1B1 com *EcoRI*, liberando o inserto de 1,5 Kb (L1 BPV 1); **(C)** Construção pPICZAL1B1: M- marcador molecular 1 Kb plus; 1- Digestão da construção pPICZAL1B1 com *EcoRI*, linearizando a construção em 4,8 Kb, 2- Digestão da construção pPICZAL1B1 com *EcoRI* e *XhoI*, liberando o inserto de 1,5 Kb (L1 BPV 1).

A levedura *P. pastoris* foi transformada com a construção e o vetor pPICZA e os recombinantes selecionados em meio YPDS com zeocina foram analisados quanto à presença do cassete de expressão pPICZAL1B1 integrado no genoma da levedura *P. pastoris* por PCR

de colônia usando os *primers* AOX1. A reação resultou na amplificação de um fragmento em torno de 1,5 Kb, correspondente ao gene L1 de BPV 1, e outro de aproximadamente 2,2 Kb, referente ao gene AOX1 (Figura 2). Este resultado também aponta para um fenótipo Mut⁺ (*Methanol utilization plus*) dos clones recombinantes.

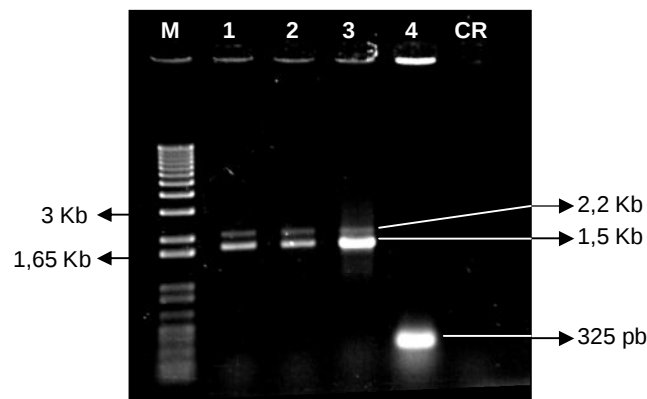


Figura 2. PCR das colônias de *P. pastoris* X-33/pPICZAL1B1 usando os *primers* AOX1. M- marcador molecular 1 Kb plus; 1 a 3- Clones *P. pastoris* X-33/pPICZAL1B1 amplificando fragmento de 1,5 Kb (gene L1 de BPV 1) e fragmento de 2,2 Kb (gene AOX1) contido no cassete de expressão; 4- *P. pastoris* X-33/pPICZA amplificando fragmento de 325 pb (promotor AOX1 contido no vetor pPICZA); CR- controle da reação (sem DNA).

Os recombinantes X-33/pPICZAL1B1, que apresentaram resultados positivos para a PCR de colônia, foram cultivados em frascos com meio contendo metanol para análise da expressão do gene L1 e da produção da proteína L1.

Após 96 horas de indução com metanol 2%, o RNA total foi extraído e submetido a um RT-PCR a fim de verificar a transcrição do gene L1 de BPV 1. A reação de RT-PCR amplificou um fragmento de 500 pb referente a uma região interna do gene L1, a partir do cDNA obtido com a transcrição reversa, nos clones X-33/pPICZAL1B1 (Figura 3). O transformante controle X-33 transformado com o vetor pPICZA foi negativo para a amplificação.

Para descartar a possibilidade de contaminação das amostras de RNA total com DNA genômico da levedura, uma reação de transcrição reversa sem a transcriptase reversa foi realizada para as amostras analisadas. A amplificação foi negativa para a detecção do produto referente ao gene L1 nas amostras analisadas (Figura 3).

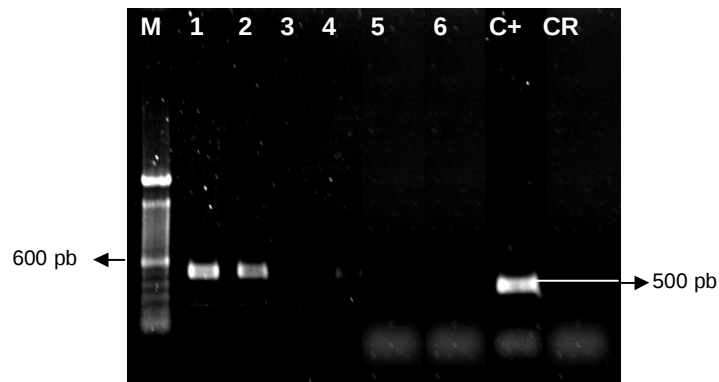


Figura 3. RT-PCR dos Recombinantes X-33/pPICZAL1B1 após 96h de indução com metanol 2%. M- marcador molecular 100 pb; 1 e 2- Clones *P. pastoris* X-33/pPICZAL1B1; 3- Clones *P. pastoris* X-33/pPICZA (vetor vazio, controle negativo); 4 a 6- Clones *P. pastoris* X-33/pPICZAL1B1 e *P. pastoris* X-33/pPICZA sem transcriptase reversa; C+- controle positivo (plasmideo pPICZAL1B1); CR- controle da reação (sem DNA). O tamanho do fragmento gerado pela RT-PCR é 500 pb.

Para análise para produção da proteína L1, o extrato protéico, após ser purificado e dialisado, foi quantificado pelo método de Bradford para a realização de um Dot Blot. A imunodetecção da proteína L1 de BPV 1 realizada tanto com o anticorpo anti-His (Figura 4A) quanto com o anticorpo CamVir1 (Figura 4B) foi capaz de detectar especificamente a produção da proteína L1.

Discussão

Os papilomavírus são importantes agentes infecciosos humanos e animais. Notadamente no gado bovino, causam o aparecimento de papilomas epiteliais, bem como câncer e tumores epiteliais. Devido à falta de sistemas *in vitro* para produção de vírions ou

proteínas virais, as técnicas de clonagem e expressão gênica tornaram-se instrumentos valiosos no desenvolvimento de vacinas contra o papilomavírus (Campo, 2002).

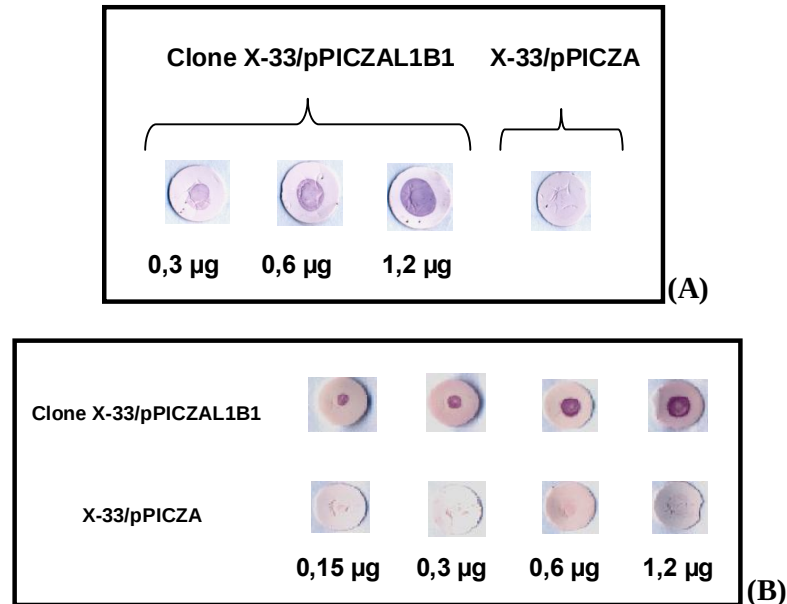


Figura 4. Dot Blot dos recombinantes X-33/pPICZAL1B1 após 96 h de indução com metanol 2%. **(A)** Dot Blot usando anticorpo primário anti-L1 (CamVir1) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina conseguiu detectar a proteína L1 de BPV 1 a partir do extrato protéico do clone X-33/pPICZAL1B1 nas três quantidades de proteína testadas (0,3, 0,6 e 1,2µg), enquanto que no clone X-33/pPICZA não foi detectada a proteína L1 de BPV 1; **(B)** Dot Blot usando anticorpo anti-His conjugado a fosfatase alcalina detectou a proteína L1 de BPV 1 a partir do extrato protéico do clone X-33/pPICZAL1B1 nas quatro quantidades de proteína testadas (0,15, 0,3, 0,6 e 1,2µg), enquanto que no clone X-33/pPICZA não foi detectada a proteína L1 de BPV 1.

Nesse trabalho, nós descrevemos o uso do sistema de expressão baseado em células da levedura *Pichia pastoris* com a finalidade de produzir a proteína L1 do papilomavírus bovino tipo 1 como primeiro passo para implementação de uma estratégia vacinal contra infecções por papilomavírus. Inicialmente, o gene L1 de BPV 1 foi amplificado com o uso de *primers* específicos que continham a sequência de Kozak para células de levedura. O produto amplificado foi clonado no vetor pGEM-T *Easy* e subclonado sob a regulação do promotor *AOX1* e em fase de leitura com uma cauda de poli-histidina presentes no vetor pPICZA. A construção, denominada pPICZAL1B1, foi transformada em células da levedura *Pichia*

pastoris linhagem X-33. A presença de RNA mensageiro do gene L1 foi detectada por RT-PCR e a produção da proteína foi confirmada por Dot Blot por meio do uso de anticorpos anti-His e anti-L1.

Uma variedade de sistemas de expressão tem sido investigada para a expressão das proteínas do capsídeo dos papilomavírus como potenciais sistemas de produção de vacinas. Normalmente, a superexpressão de proteínas em sistemas bacterianos tem sido empregada. No entanto, a expressão de várias proteínas em bactérias tem produzido proteínas com problemas na conformação e no processamento. Para superar esses problemas, vários outros sistemas de expressão têm sido empregados (Morton and Potter, 2000).

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica capaz de metabolizar metanol com única fonte de carbono. O primeiro passo no metabolismo do metanol é a oxidação do metanol a formaldeído, pela ação da enzima álcool oxidase (AOX). Existem dois genes que codificam a álcool oxidase em *P. pastoris*, *AOX1* e *AOX2*, porém o *AOX1* é responsável pela maioria da atividade da enzima na célula. A expressão do gene *AOX1* é fortemente regulada e induzida por metanol a altíssimos níveis (Cregg *et al.*, 2000). A capacidade de indução do promotor *AOX1* pelo metanol pode, portanto, ser usada para direcionar a expressão de proteínas recombinantes em altos níveis

A transformação de linhagens X-33 de *P. pastoris*, que possui genótipo selvagem e fenótipo Mut⁺, com vetores linearizados no promotor *AOX1* gera transformantes Mut⁺, já que a integração ocorre por inserção em um único evento de *crossover* na região homóloga do locus *AOX1* (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). O padrão da amplificação dos recombinantes com os primers *AOX1* sugerem que a integração do cassete de expressão no genoma da levedura ocorreu por inserção e que, dessa forma, os transformantes X-33/pPICZAL1B1 mantiveram o fenótipo Mut⁺ da linhagem X-33.

Scorer *et al.* (1993), em um estudo para produção de uma proteína do envelope de HIV-1 em *P. pastoris*, observaram um truncamento na transcrição do RNAm gerado por um sítio de truncagem identificado como sendo muito similar a sequência consenso que promove terminação prematura da transcrição em levedura. Nossos resultados mostram a presença de transcritos do gene L1 nos clones recombinantes através de RT-PCR sugerindo a presença de RNAm íntegros e, por conseguinte, passíveis de expressar o gene heterólogo após a indução dos recombinantes com metanol.

O sistema de expressão em *P. pastoris* tem sido amplamente utilizado para produção de uma grande variedade de proteínas heterólogas de diversos organismos (Cereghino and Cregg, 2000). Porém, os níveis de produção variam muito dependendo do tipo e das características da proteína a ser produzida. Os dados apresentados no Dot Blot usando o anticorpo CamVir1 evidenciaram a capacidade da levedura *P. pastoris* de produzir especificamente a proteína L1 de BPV 1. O Dot Blot com o anticorpo anti-His corroborou a produção da proteína L1 e aponta também para a presença de uma proteína íntegra, pois o anticorpo usado reconhece uma cauda de poli-histidina fusionada na porção C-terminal da proteína heteróloga.

Contudo, não foi possível detectar a proteína L1 em ensaios de imunoblot (Western Blot), sugerindo a produção de uma concentração muito baixa da proteína. Uma explicação para os baixos níveis de expressão pode estar relacionado a falhas no processo de tradução da proteína heteróloga. Genes eucarióticos apresentam um alto conteúdo GC, portanto eles são mais eficientemente traduzidos do que os genes virais, que geralmente são ricos em AT (Haas *et al.*, 1996). Zhou e colaboradores (1999) observaram que o gene L1 de BPV 1 contém códons de tradução raros. Eles, portanto, substituíram os códons raros por códons mais comumente utilizados e analisaram os níveis de expressão do gene L1 de BPV-1 selvagem e o com códons modificados em experimentos de transfecção transiente. Ambos produziram altos

níveis de RNAm de L1 no citoplasma das células, mas apenas o com códons modificados produziu níveis detectáveis de proteína L1.

Trabalhos recentes têm demonstrado que a otimização de códons pode melhorar os níveis de expressão em diversos sistemas. A otimização de códons pode melhorar a expressão usando gene sintético os códons raros são substituídos por códons preferenciais para uma tradução eficiente em *P. pastoris*.

Conclusão

Os dados apresentados neste trabalho confirmam a viabilidade das células de *P. pastoris* como sistema heterólogo para produção da proteína L1 de BPV 1, um candidato natural para o desenvolvimento de vacinas contra a infecção pelo BPV. Foi hipotetizado que diferenças no uso de códons preferenciais foram a causa mais provável dos problemas de expressão observados.

Agradecimentos

Agradecemos à Dr^a. Rita Stocco (Instituto Butantan, SP, Brasil) por ter cedido gentilmente o plasmídeo pAT153 contendo o genoma completo de BPV 1 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- Barr E and Tamms G (2007) Quadrivalent human papillomavirus vaccine. Clin Infect Dis. 45(5):609-7.
- Borzacchiello G and 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* 72:248-254.
- Campo MS (2002) Animal models of Papillomavirus Pathogenesis. *Virus Research* 89:249-261.
- Campo MS (2006) Bovine papillomavirus: old system, new lessons? *In: Campo, M.S. (eds) Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond*. Caister Academic Press, Wymondham, England, Chap 23.
- Cereghino JL and Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology* 24:45-66.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J and Higgins DR (2000) Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 16:23-52.
- da Silva, DM, Eiben, GL, Fausch, SC, Wakabayashi, MT, Rudolf, MP, Velders, MP and Kast, WM (2001). Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J. Cell Physiol*, 186, 169-182.
- de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U and zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
- Ghim SJ, Young R and Jenson AB (1996) Antigenicity of bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) L1 virus-like particles compared with that of intact BPV-1 virions. *J Gen Virology* 77:183-188.
- Haas J, Park EC and Seed B. (1996) Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol*. 6: 315-324.
- Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, Wagner ER, Grindlay GJ, Armstrong A, McGarvie GM, Schiller JT, Lowy DR and Campo MS (1996) Virus-like particles of

- bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 219: 37- 44.
- Leal AM, Ferraz OP, Carvalho C, Freitas AC, Beniston RG, Beçak W, Campo MS and Stocco dos Santos RC (2003). Quercetin induces structural chromosome aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4. *Veterinary Comparative Pathology* 1:15-21.
- Linder S, Schliwa M and Kube-Granderath E (1996) Direct PCR Screening of *Pichia pastoris* Clones. *BioTechniques* 20:980-982.
- Liu RS, Yang KY, Lin J, Lin YW, et al. (2004) High-yield expression of recombinant SARS coronavirus nucleocapsid protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *World J Gastroenterol.* 10: 3602-3607.
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B and Harvey LM (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249–270.
- McLean CS, Churcher MJ, Meinke J, Smith GL, Higgins G, Stanley M and Minson AC (1990) Production and characterization of a monoclonal antibody to human papillomavirus type 16 using recombinant vaccinia virus. *J Clin Pathol* 43:488-492.
- Melo CB and Leite RC (2003) Papilomatose Bovina. *Ciênc. Vet. Tróp.* 6(1): 1-12.
- Morton CL and Potter PM (2000) Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda*, and COS7 cells for recombinant gene expression. Application to a rabbit liver carboxylesterase. *Mol biotechnol* 16: 193-202.
- O'Brien and Campo MS (2002) Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Research* 88(1-2):103-17.
- Scorer CA, Buckholz RG, Clare JJ and Romanos MA (1993) The intracellular production secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *P. pastoris*. *Gene* 136:111-119.

- Stanley MA (2005). Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine* 24(S1):S16-S22.
- Zhou J, Liu WJ, Peng SW, Sun XY and Frazer I. (1999) Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *J. Virol.* 73:4972–4982.
- Zhou J, Stenzel DJ, Sun XY and Frazer IH (1993) Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles *in vitro*. *J Gen Virol* 74:763-768.
- zur Hausen, H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342-350.

6. CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* transformada com o cassete de expressão pPICZAL1B1, quando induzida por metanol, é capaz de expressar o gene L1 do papilomavírus bovino tipo 1. Os dados confirmam a possibilidade do uso do sistema de expressão heterólogo baseado em células de *P. pastoris* para a produção de proteínas de BPV.

Contudo, foi visto a necessidade de algumas modificações para que este sistema possa aumentar a expressão do gene L1 necessário para um incremento nos níveis de produção da proteína com vistas à produção de VLPs. Podemos citar como exemplo a necessidade do uso de gene L1 de BPV 1 sintético com otimização dos códons para expressão em levedura *P. pastoris*, haja visto o grande número de dados mostrando discrepância entre dos códons raros de papilomavírus bovino para códons preferenciais de *P. pastoris*.

7. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

7.1 Vetor de expressão pPICZA

Para construção do cassete de expressão foi utilizado o vetor de expressão de *P. pastoris* pPICZA.

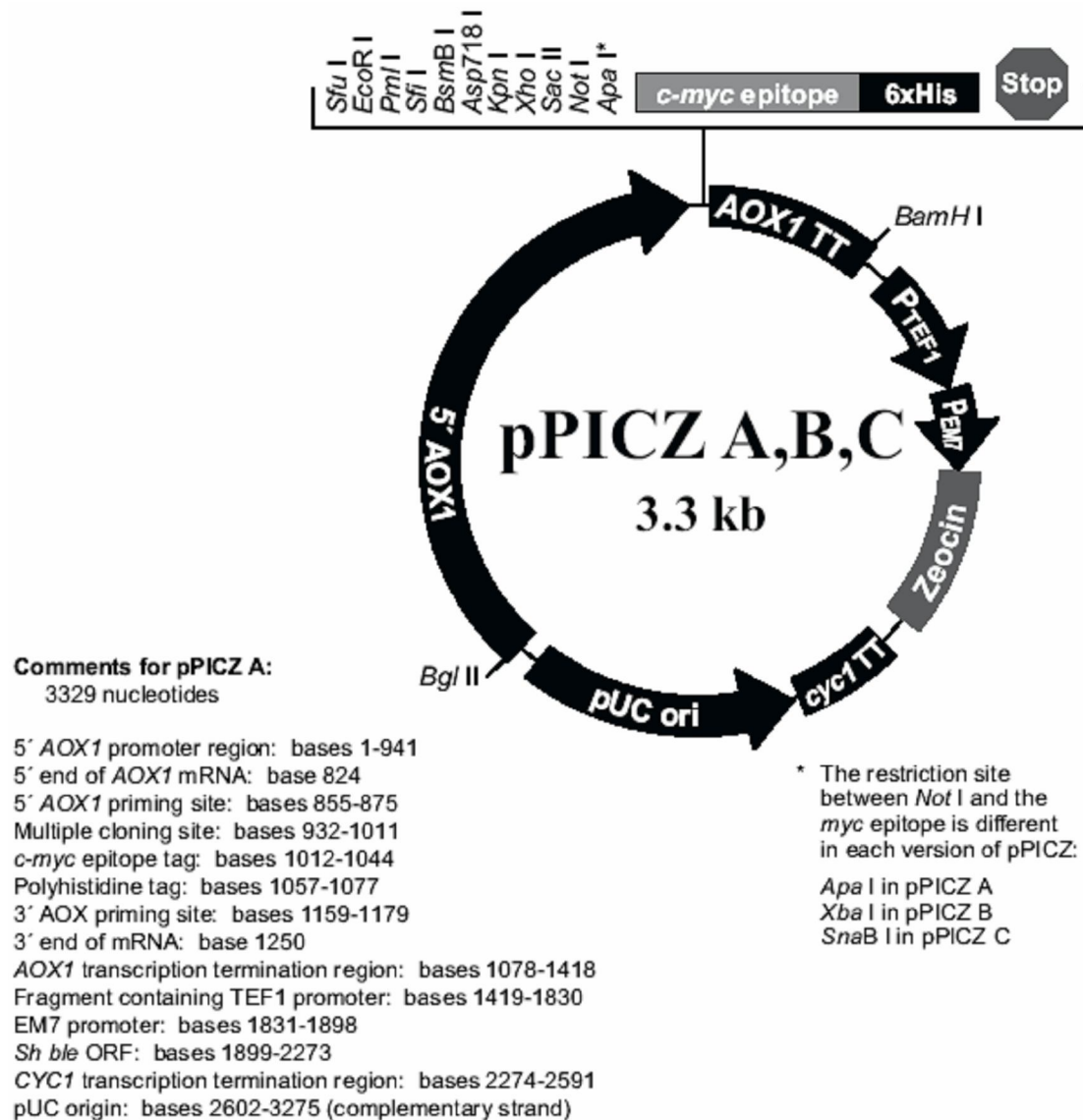


Figura 1. Mapa físico do vetor pPICZA (Invitrogen).

O pPICZA possui: sítios para pareamento de *primers* específicos (5' e 3' *AOX1* *priming* site) utilizados no sequenciamento do cassete de expressão para confirmação de clonagem; sítios múltiplos de clonagens, o epítipo *myc* e uma cauda de polihistidina (Figura 2). Também podem ser observados o sítio de iniciação de transcrição do RNAm (5' *end of AOX1 mRNA*) e o sítio de poliadenilação (3' *polyadenylation site*).

```

                    5' end of AOX1 mRNA
                    |
811 AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGCGACTGG TTCCAATTGA
                    |
                    5' AOX1 priming site

871 CAAGCTTTTG ATTTTAACGA CTTTAAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

          Sfu I      EcoR I      Pml I      Sfi I      BsmB I Asp718 I Kpn I Xho I
931 ATTCGAAACG AGGAATTCAC GTGGCCCAGC CGGCCGTC TC GGATCGGTAC CTCGAGCCGC

          Sac II Not I      Apa I      myc epitope
991 GCGGCCCGCC AGCTT GGGCCC GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG
          Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

                    Polyhistidine tag
1042 AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTTAGCCT TAGACATGAC
          Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

1098 TGTCCTCAG TTCAAGTTGG GCACTTACGA GAAGACCGGT CTTGCTAGAT TCTAATCAAG

                    3' AOX1 priming site
1158 AGGATGTCAG AATGCCATTT GCCTGAGAGA TGCAGGCTTC ATTTTGTGATA CTTTTTTATT

                    3' polyadenylation site
1218 TGTAACCTAT ATAGTATAGG ATTTTTTTTG TCATTTTGTT

```

Figura 2. Parte da sequência do vetor pPICZA (Invitrogen).

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1

INSTRUÇÕES PARA AUTORES

Revista
GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

ISSN 1415-4757
Ribeirão Preto, Brasil

Genetics and Molecular Biology - NOTICE TO CONTRIBUTORS**SCOPE AND POLICY**

Genetics and Molecular Biology (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética ([Brazilian Society of Genetics](#)).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines.

Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal as judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board are reviewed by the Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

SUBMISSION OF PAPERS**1. Manuscripts should be submitted to:**

Angela M. Vianna-Morgante, Editor-in-Chief

Genetics and Molecular Biology

Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736

14025-670 Ribeirão Preto, SP – Brasil

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

a) A cover letter stating that all authors have approved the submission of the manuscript. The letter must be signed by the Corresponding Author and must inform the e-mail addresses of all other authors so that they can be contacted by the Editorial Office for confirmation of the submission.

b) An electronic copy of the text, tables and figures. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h). Mailed CD-ROMs must be labeled with the first author's last name, platform and software (see detailed instructions below). This CD should also include files of Supplementary Material to be published online only, as well as of any unpublished or in press material cited in the text. Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

c) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

3. Categories of Contribution**3.1. Research Articles**

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; formatted to A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the reference section.

The text includes the following elements:

Introduction – Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods –Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results –Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. Use standard abbreviations for journal titles.

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted.

f) Internet Resources Section

this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. When databases are cited, date of consultation must be stated.

Sample Internet Resource citation :

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005) LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm

g) Tables: each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

h) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Scanned figures should not be submitted. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Color illustration can be accepted, but authors may be asked to defray the cost.

i) Nomenclature should adhere to current international standards.

j) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

k) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

m) Supplementary Material: Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. This material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures, they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. For online access, Supplementary material should be in PDF, JPEG or GIFF formats

In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement: *Supplementary material - the following online material is available for this article:*

- Table S1

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

3.2 Short Communications

Present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles

Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories

Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs and Copyright Transfer

Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval. A form of consent to publish and transfer of copyright will have to be signed by the corresponding author, also on behalf of any co-authors.