

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA CONSTRUÇÃO VACINAL
BASEADA NO GENE E5 DE BPV USANDO “CÓDON USAGE”
A SER APLICADA EM IMUNIZAÇÃO GENÉTICA**

RAFAELLE CAVALCANTE DE LIRA

VIRTUS IMPAVIDA

**RECIFE
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA CONSTRUÇÃO VACINAL BASEADA
NO GENE E5 DE BPV USANDO “CÓDON USAGE” A SER APLICADA
EM IMUNIZAÇÃO GENÉTICA**

RAFAELLE CAVALCANTE DE LIRA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Genética da Universidade
Federal de Pernambuco como
requisito para obtenção do grau
de Mestre em Genética pela
UFPE

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas

**RECIFE
2010**

Lira, Rafaelle Cavalcante de

Desenvolvimento de uma construção vacinal baseada no gene E5 de BPV usando “códon usage” a ser aplicada em imunização genética/ Rafaelle Cavalcante de Lira. – Recife: O Autor, 2010.

81 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (dissertação) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biomedicina, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Papilomavírus bovino 2. Gene E5 3. Vacina- imunização genética I. Título.

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/ CCB – 2010- 059

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
GENÉTICA**

**Parecer da comissão examinadora da dissertação/tese de:
Rafaelle Cavalcante de Lira**

intitulada:

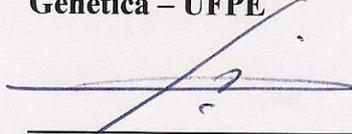
**Desenvolvimento de uma construção vacinal baseada no gene E5 de BPV usando
“Códon Usage” a ser aplicada em imunização genética.**

**A comissão examinadora considera o presente trabalho
APROVADO**

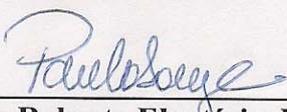
**Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Rafaelle Cavalcante de Lira faz
jus ao grau de Mestre em Genética pela UFPE. Recife, 09/03/2010**



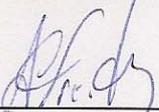
1º Examinador: Dr. Tercílio Calsa Júnior
Genética – UFPE



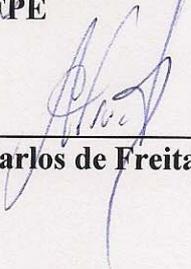
2º Examinador: Dr. Rafael Dhália
Instituto Aggeu Magalhães



3º Examinador: Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Universidade Federal Rural de Pernambuco



Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas
Genética - UFPE



Coordenador: Dr. Antonio Carlos de Freitas

“Acredito em fatos, não em intenções. Acredito em atitudes, não em discursos. Acredito em posturas éticas, não em regras de moral. Acredito em fazer acontecer, não em esperar que aconteça. Acredito em criatividade, não em obstáculo. O que importa são as tentativas e não os acertos. [...] **O prazer de continuar buscando é infinitamente maior que o sucesso de alcançar.**”

Geraldo Eustáquio de Souza

**Dedico esta obra ao meu marido,
Josélio Joubert e aos meus pais,
Genivaldo e Irenice com todo amor.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, que sempre me deu força e discernimento para concretizar os meus sonhos.

Ao meu marido, Josélio Joubert, por todos os incentivos, pelo apoio incondicional, amor dedicado, cumplicidade e por sempre acreditar nos meus sonhos.

Aos meus pais, Genivaldo e Irenice, e as minhas irmãs, Kaliane e Joedna, pelo carinho e apoio integral, pela ajuda e amor constante a mim dedicado.

Aos meus sogros, Josélio e Joana d'Arc, pelo incentivo, apoio, companheirismo e amizade.

Ao professor Antonio Carlos de Freitas pela oportunidade de fazer parte do GEMAP, por todos os ensinamentos, pela confiança depositada em mim e principalmente pelo incentivo e preocupação comigo.

Aos professores Rafael Dhália e Laura Helena Vega Gonzalez Gil integrantes do LaViTE (Instituto Aggeu Magalhães) por terem me acolhido no laboratório para que eu pudesse realizar etapas cruciais do meu experimento.

As companheiras de apartamento, Angélica, Carolina, Isadora, Jaqueline e Sinara por todos os incentivos, pela amizade, conversas e apoio diário tanto nos momentos difíceis quanto nos de felicidade.

Aos amigos e companheiros do grupo GEMAP, Bárbara, Elyda, Felipe, Janaine, Breno, Marcelo, Filipe, Júlia, Cybelle, Nayara pela ajuda sempre concedida e nunca questionada, pela amizade, companheirismo e pela confiança depositada. Agradeço principalmente a André e Eliane por todos os ensinamentos, pela ajuda intelectual e apoio incondicional.

Agradeço a todos os veteranos do LGM e associados, Rochane, Will, Billy, Fernanda, Rute, Rodrigo, Brígida, Teresa, Luciana, Esteban.

Aos amigos que conquistei no LaViTE, Georgia, Sandra, Isabelle, Fábria, Renato, Sabrina, Andréa, Clintiano, Jeferson, Verônica e Liciania. Agradecimento especial a Mariana, por todos os ensinamentos prestados com tanta dedicação, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos da turma de mestrado 2008 pela amizade e companheirismo.

Aos funcionários do Departamento de Genética, Dona Zizi e Romildo.

A todos os meus amigos que direta ou indiretamente me apoiaram, que estiveram presentes em muitas etapas importantes da minha vida e que influenciaram o meu crescimento pessoal.

SUMÁRIO

| Item | Página |
|--|---------------|
| Lista de Abreviaturas | i |
| Lista de Figuras | iii |
| Lista de Tabelas | iv |
| Resumo | v |
| Abstract | vi |
| | |
| 1. Introdução | 7 |
| 2. Revisão da Literatura | |
| 2.1. Papilomavírus | 9 |
| 2.2. Ciclo viral dos Papilomavírus | 13 |
| 2.3. Papilomavírus Bovino (BPV) | 14 |
| 2.4. Papilomatose Bovina | 15 |
| 2.5. Resposta Imune ao Papilomavírus Bovino | 20 |
| 2.6. Proteína E5 do Papilomavírus Bovino | 23 |
| 2.7. Vacina de DNA | 29 |
| | |
| 3. Objetivos | 38 |
| 4. Materiais e Métodos | |
| 4.1. Construção do gene sintético E5 | 39 |
| 4.2. Preparo de células competentes e transformação | 39 |
| 4.3. Mini-extração plasmidial | 40 |
| 4.4. Subclonagem do gene E5 em vetor de expressão pCI-neo | 40 |
| 4.5. Sequenciamento | 43 |
| 4.6. Cultivo e transfecção <i>in vitro</i> de células eucarióticas | 44 |
| 4.7. Análise da expressão da proteína E5 | 44 |
| 4.7.1. Extração de RNA total das células 293 transfectadas | 44 |
| 4.7.2. Síntese de cDNA e RT-PCR | 45 |
| 4.7.3. Avaliação da expressão da proteína E5 através de SDS- PAGE | 46 |
| 4.7.4. Avaliação da expressão da proteína E5 através de Dot Blot | 46 |
| 4.7.5. Imunoprecipitação | 47 |

| | |
|--|----|
| 4.7.6. Avaliação da expressão da proteína E5 por Western Blot | 48 |
| 5. Resultados | |
| 5.1. Construção do gene sintético E5 | 49 |
| 5.2. Subclonagem do gene E5 em vetor de expressão pCI-neo | 50 |
| 5.3. Análise da expressão da proteína E5 | |
| 5.3.1. Análise de transcrição do gene E5 | 53 |
| 5.3.2. Avaliação da expressão da proteína E5 através de gel SDS-PAGE | 54 |
| 5.3.3. Avaliação da expressão da proteína E5 através de Dot Blot | 55 |
| 5.3.4. Avaliação da expressão da proteína E5 através de Western Blot | 56 |
| 6. Discussão | 57 |
| 7. Conclusões | 62 |
| 8. Referências Bibliográficas | 63 |
| 9. Anexo | 78 |
| 10. Memorial do(a) aluno(a) | 81 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1 – Proteína ativadora-1

APC – Célula apresentadora de antígenos

BHV-1 – Vírus da Herpes Bovina tipo 1

BPV – Papilomavírus Bovino

BRSV – Vírus Sincicial Respiratório Bovino

BVDV – Vírus da Diarréia Bovina

CMV - Citomegalovírus

COPV – Papilomavírus oral canino

COX-2 – Ciclooxigenase-2

CRPV – Papilomavírus do coelho *cottontail*

CTL – Linfócitos T Citotóxicos

DCs – Células dendríticas

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DO₆₀₀ - Densidade ótica a 600 nm

E – Gene que codifica proteína Early ou imediata

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* ou ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF – Fator de crescimento epidermal

EGF-R – Receptor do fator de crescimento epidermal

G – Glicina

GI – Gastrointestinal

HC – Cadeia pesada

HEK-293 – Human Embryonic Kidney Cell (Célula Embrionária de rim humano)

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV – Papilomavírus humano

IFN – Interferon

IL-12 – Interleucina-12

IM – Injeção intramuscular

Kb – Kilobase

kDa – Kilodalton

L – Gene que codifica proteína Late ou tardia

LC – Células de Langerhans

LCR – Região longa de controle

MAP – Proteína que estimula divisão celular

MHC I – Complexo maior de histocompatibilidade de classe I

mRNA – RNA mensageiro

ORF – *Open reading frame* ou quadro aberto de leitura

p53 Proteína 53 – Fator de transcrição que regula o ciclo celular

p300 - Histona acetiltransferase, molécula co-ativadora de transcrição

PBS – Phosphate buffered saline

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDGF-R – Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas

PI 3-K – Fosfoinositídeo 3-quinase

pRb Proteína do retinoblastoma – supressora de tumor

PV – Papilomavírus

Q – Glutamina

RIPA – Tampão de radioimunoprecipitação

RNA – Ácido ribonucléico

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

TAP – Transportador associado ao peptídeo

TCD4+ - Célula T auxiliar

TCD8+ - Célula T citotóxica

tRNA – RNA transportador

TMB – Tetrametil dihidroclorato de benzidina

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Morfologia do papilomavírus | 10 |
| Figura 2. Representação linear do genoma de BPV-1 | 10 |
| Figura 3. Ciclo de infecção do PV | 14 |
| Figura 4. Representação da papilomatose bovina | 18 |
| Figura 5. Representação diagramática da carcinogênese em bexiga urinária | 19 |
| Figura 6. Representação do sarcóide eqüino | 20 |
| Figura 7. Seqüência de aminoácidos da proteína E5 de BPV | 23 |
| Figura 8. Esquema de um complexo entre dímeros de E5 e o PDGF β -R | 25 |
| Figura 9. Modelo de interação entre a proteína E5 e o PDGF β -R | 26 |
| Figura 10. Modelo do efeito da proteína E5 do HPV16 | 29 |
| Figura 11. Indução da imunidade humoral e celular pela vacina de DNA | 33 |
| Figura 12. Esquema da digestão dupla do pBlueScriptE5sint e pCI-neo | 41 |
| Figura 13. Esquema do gene E5 otimizado | 49 |
| Figura 14. Seqüência de DNA do gene E5 | 50 |
| Figura 15. Digestão dupla do pBlueScriptE5sintB1/B2 e linearização do pCI-neo | 50 |
| Figura 16. Esquema da PCR para detecção do clone pCIE5sintB1/B2 | 51 |
| Figura 17. PCR dos clones contendo a construção pCIE5sintB1/B2 | 51 |
| Figura 18. Reação de PCR para confirmação da orientação do gene E5 | 52 |
| Figura 19. PCR para verificar a orientação do gene E5 | 52 |
| Figura 20. Digestão dupla do clone pCIE5sintB1/B2 | 52 |
| Figura 21. RT-PCR para análise da transcrição de E5 | 53 |
| Figura 22. Análise por eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE | 54 |
| Figura 23. Dot blot para detecção da proteína E5 | 55 |
| Figura 24. Imunoprecipitação da proteína E5 | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 01: Reação de digestão do pBlueScriptE5B1/B2 e pCI-neo | 42 |
| Tabela 02: Reação de ligação do vetor pCI-neo e fragmento E5 | 42 |
| Tabela 03: Reação de PCR para os primers de detecção e orientação do fragmento | 43 |
| Tabela 04: Seqüência dos primers utilizados para detecção do fragmento E5 | 43 |
| Tabela 05: Seqüência dos primers para verificação da orientação do fragmento E5 | 43 |
| Tabela 06: Seqüência dos primers para seqüenciamento do plasmídeo pCIE5sintB1/B2 | 43 |
| Tabela 07: Reação para a transcrição reversa e controle negativo | 45 |
| Tabela 08: Primers utilizados no RT-PCR | 45 |

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, gerando importantes perdas econômicas aos criadores. Os BPVs tipo 1 e 2 são carcinogênicos e estão relacionados com o câncer da bexiga urinária e o tumor sarcóide em equino. Como existem muitos animais já infectados e afetados pela doença, uma estratégia vacinal terapêutica torna-se necessária e muito aguardada pelos criadores. A imunização genética é uma estratégia bastante eficaz na indução de imunidades humoral e celular em grande número de modelos animais. O foco deste trabalho foi realizar a construção e avaliação funcional *in vitro* do vetor vacinal pCIE5sintB1/B2, usando o gene E5 otimizado para expressão em célula de mamífero. As sequências do gene E5 dos BPVs 1 e 2 foram obtidas do GeneBank e analisadas quanto a suas diferenças e ao uso preferencial de códons, sendo então construída uma sequência otimizada a qual foi sintetizada (E5sintB1/2), contendo um epítipo AU1 na região N-terminal. O gene E5sint foi então clonado no vetor de expressão pCI-neo usando sítios de restrição inseridos no gene sintético. A construção pCIE5sintB1/2 foi seqüenciada para confirmação. Para análise da funcionalidade o vetor pCIE5sintB1/2 foi utilizado para transfectar em células 293, usando o Kit TransFast. Após 48 horas de cultivo, as células foram coletadas e os extratos celulares processados para preparação do extrato protéico celular e de RNA total. A expressão gênica foi avaliada por meio de RT-PCR, SDS-PAGE, Dot Blot e Western Blot (usando anticorpo contra o epítipo AU1). Os resultados obtidos mostraram que apenas as células transfectadas com a construção pCIE5sintB1/B2 apresentaram transcrição do gene E5 e conseqüente produção da proteína. Estes resultados confirmam a expressão do antígeno vacinal em células de mamífero.

Palavras-Chave: Papilomavírus bovino, gene E5, vacina DNA.

ABSTRACT

The papillomavirus constitute a group of small DNA viruses characterized for inducing the formation of lesions that are in general benign, could regress naturally or change into malignant tumors, and it can cause also economic consequences. BPV type 1 and 2 are related with the cancer of the urinary bladder and equine sarcoid. As many bovine are already infected and affected for the disease, a therapeutic vaccine strategy becomes necessary and awaited by the creators. The genetic immunization is a quite effective strategy in the induction of humoral and cellular immunities in a great number of animal models. The focus of this work was to accomplish the construction and evaluation *in vitro* of the vector pCIE5sintB1/B2 function, using the gene E5 optimized for expression in mammal cell. The sequence of the gene E5 of BPVs 1 and 2 were obtained in GeneBank and analyzed as their differences and to the "codon usage", and an optimized sequence was synthesized (E5sintB1/2), containing an AU1 epitope in the N-terminal region. The gene E5sint was cloned in the expression vector pCI-neo using restriction sites inserted in the synthetic gene. The construction pCIE5sintB1/2 was sequenced for confirmation. For analysis of the functionality the vector pCIE5sintB1/2 was utilized to transfect in 293 cells, through the Kit TransFast. After 48 hours of cultivation, the cells were collected and the cellular extracts processed for preparation of the protein extract and the total RNA. The gene expression was evaluated through RT-PCR, Dot Blot and Western Blot (using antibody against the AU1 epitope). The results showed that just the cells transfected with the construction pCIE5sintB1/B2 presented transcription of the gene E5 and consequent production of the protein. These results confirm the vacinal antigen expression in mammal cells.

Key Words: Bovine Papillomavirus, gene E5, DNA vaccine.

1. INTRODUÇÃO

Os papilomavírus (PVs) constituem um grupo de pequenos vírus de DNA de dupla fita caracterizados por induzirem a formação de verrugas ou papilomas numa grande variedade de organismos. São vírus capazes de transformar células basais do tecido epitelial, induzindo tumores que, por vezes, regridem naturalmente, mas, em alguns casos, geram um processo maligno e fatal.

O papilomavírus bovino (BPV) tem sido amplamente caracterizado tanto por ser considerado um modelo experimental ideal para o estudo do papilomavírus humano (HPV), quanto pelo estudo etiológico da doença em bovinos, sendo associado à papilomatose cutânea, tumores na bexiga (hematúria enzoótica) e no trato digestivo superior.

Até o momento são bem caracterizados seis diferentes tipos de BPVs (BPVs de 1 a 6), e recentemente outros quatro novos tipos (BPVs 7 a 10) tiveram seu genoma seqüenciado. Os BPVs 1 e 2 estão relacionados com o câncer de bexiga urinária e o BPV 4 com câncer do trato digestório superior. Embora os PVs sejam espécie-específico, existe um único caso de infecção cruzada dos BPVs 1 e 2 em cavalos e outros eqüídeos, resultando em uma lesão tumoral comum em eqüinos, o sarcóide eqüino, que pode levar ao sacrifício do animal.

Uma estratégia vacinal dirigida para a prevenção do sarcóide em eqüinos, da papilomatose cutânea e câncer de bexiga em bovinos é muito importante, entretanto, como existem muitos animais já infectados e afetados pela doença, uma proposta terapêutica se torna necessária e muito aguardada pelos criadores. Porém, devido ao complexo ciclo de replicação dos papilomavírus, não há um sistema de propagação em laboratório que permita a produção de vírions para fins vacinais.

A imunização genética tem sido documentada como uma estratégia efetiva para a indução de imunidades humoral e celular em grande número de modelos animais, protegendo o hospedeiro contra novas infecções virais e levando à regressão das lesões já estabelecidas.

E5 é a principal proteína dos BPVs 1 e 2, relacionada à transformação celular, e sua expressão ocorre tanto no início como durante a infecção, tornando esse gene importante para ser utilizado na vacina de DNA. Este trabalho teve como finalidade a construção de vetores vacinais baseados no gene sintético E5 de BPVs 1 e 2 e a avaliação de seu potencial de expressão em células de mamíferos. Além da importância

econômica do controle da infecção por BPV no contexto da pecuária nacional, este sistema também é um excelente modelo para o estudo de estratégias vacinais aplicadas a infecção pelo HPV em humanos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Papilomavírus

Os papilomavírus (PV) constituem um grupo de pequenos vírus da família *Papillomaviridae*, que comumente infectam células basais nos epitélios cutâneo e mucoso induzindo-as à formação de lesões tumorais, conhecidas como papilomas ou verrugas (Howley & Lowy, 2001). As lesões causadas são geralmente benignas, e a infecção é normalmente eliminada pela resposta celular imuno-mediada, a qual é direcionada contra antígenos virais (O'Brien & Campo, 2002). Entretanto na minoria dos casos, as lesões mucosas não regridem e podem progredir para câncer, particularmente na presença de co-fatores (Nicholls & Stanley, 2000; Zur Hausen, 2002; Campo, 2006).

Este grupo de vírus é capaz de infectar uma variedade de animais, desde pássaros até mamíferos, incluindo o homem (Zheng & Baker, 2006). Os tipos que infectam os homens são denominados abreviadamente por HPV, mas também são bem conhecidos os que infectam bovinos – BPV (Papilomavírus Bovino), coelhos – CRPV (*Cottontail Rabbit Papillomavirus* – Papilomavírus do coelho *cottontail*) e cães - COPV (*Cannine Oral Papillomavirus* – Papilomavírus oral canino). Outros animais que podem ser infectados são os veados, os cavalos, os hamsters e os macacos (Ozbun, 2002; Ferreira *et al*, 2002).

O PV é um pequeno vírus oncogênico, não-envelopado, com morfologia icosaédrica e diâmetro de 55–60nm (Figura 1). O capsídeo apresenta 72 capsômeros, formado pelos pentâmeros de 360 cópias de uma proteína designada L1, além de 12 cópias de outra proteína, denominada L2, (Baker *et al.*, 1991; Modis *et al.*, 2002) que atravessa o capsídeo e liga-se ao genoma viral, sendo este constituído por DNA circular, dupla fita com cerca de 8 Kb (de Villiers *et al.*, 2004).

O genoma do papilomavírus é composto por 8 ORFs (*Open Reading Frames*, quadro aberto de leitura) possuindo 6 genes que se expressam precocemente e dois genes mais tardiamente, denominados E (*Early - precoce*) e L (*Late - tardio*), respectivamente. O genoma pode ser dividido em três partes: a longa região de controle (LCR–*long control region* ou URR–*upstream regulatory region*) que corresponde a 15%

do genoma; a região E, que codifica proteínas envolvidas com a transformação celular (E6, E7, E5), com a maturação viral e alteração da matriz intracelular (E4) ou com a replicação e transcrição do genoma viral (E1 e E2), e abrange 45% do genoma; e a região L, a qual representa 40% do genoma, responsável pela codificação das duas proteínas capsidiais L1, que compõe 90% do capsídeo e possui um peso molecular aparente de 54-58 kDa, e L2, a qual encontra-se associada à proteína L1 e tem um peso molecular aparente de 68-76 kDa (Frazer, 1996; Han *et al.*, 1999; Nicholls & Stanley, 2000; Munger & Howley, 2002; Buck *et al.*, 2005) (Figura 2). 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).

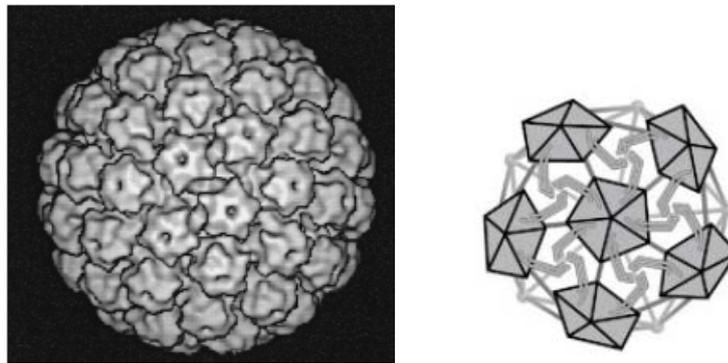


Figura 1. Morfologia do papilomavírus. Capsídeo não-envelopado e icosaédrico (Xu *et al.*, 2006; Modis *et al.*, 2002).

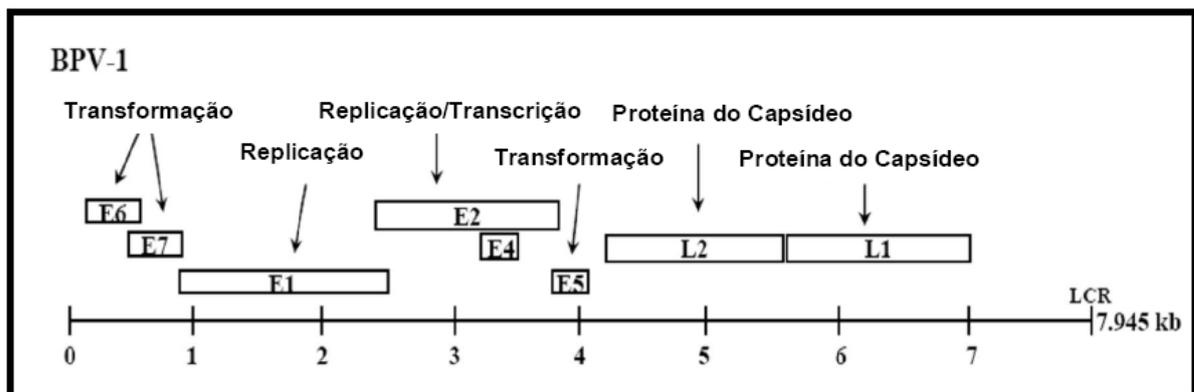


Figura 2. Representação linear do genoma de BPV-1 (adaptado de Campo, 2006).

A região LCR 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 possui inúmeras locais de ligações para os repressores e ativadores da transcrição, além da origem de replicação (Nicholls & Stanley, 2000; Munger & Howley, 2002; Borzacchiello & Roperto, 2008).

A LCR dos BPV-1, BPV-2 e BPV-5 tem doze sítios de ligação à E2, enquanto que nos tipos 3, 4 e 6, são reconhecidos apenas quatro sítios de ligação à E2. A proteína E2 é a reguladora 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).

O produto do gene E1 possui uma atividade helicase dependente de ATP, responsável pela fase inicial de replicação do DNA viral. A replicação do DNA viral é iniciada após a ligação da proteína E1 às seqüências ricas em AT da origem de replicação. O produto do gene E2 está envolvido tanto no controle da transcrição quanto na replicação do DNA viral, sendo responsável pelo reconhecimento e ligação na origem de replicação. A proteína E2 pode se apresentar na forma íntegra, a qual tem a função de reprimir a transcrição em certas condições, ou na forma N-terminal que atua como ativador transcricional (Yang *et al.*, 1991). Outra relevante função de E2 é a sua capacidade de segregar o genoma episossomal 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-se 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 (Lehman & Botchan, 1998; Skiadopoulos & McBride, 1998; Ilves *et al.*, 1999; Abroi *et al.*, 2004). Para a associação de E2 com a cromatina mitótica, o estado fosforilado da proteína E2 não é requerido (Bastien & McBride, 2000), e é provável que a proteína celular Brd4 seja a responsável pela interação de E2 com os cromossomos mitóticos (You *et al.*, 2004).

A ORF E4 codifica uma família de pequenas proteínas que são abundantes no citoplasma de queratinócitos, ajudando a fase produtiva de replicação do DNA viral (Anderson *et al.*, 1997). Em cultura de células e em infecções naturais, E4 interage com a rede de filamentos de citoqueratinas, resultando em uma reorganização do

citoesqueleto e onde provavelmente desempenha um papel auxiliar na replicação e liberação do vírus, através do rompimento do citoesqueleto citoplasmático (Doorbar, 1991; Borzacchiello & Roperto, 2008).

A proteína E5 do papilomavirus são pequenos polipeptídeos hidrofóbicos de membrana, variando desde 42 aminoácidos no BPV 4, a 83 aminoácidos no HPV 16, e a maioria apresenta atividade transformante. E5 é expressa tanto nos estágios iniciais como durante a infecção viral e sua expressão modifica a resposta celular a fatores de crescimento, assim como bloqueia a expressão de moléculas do MHC (Complexo de histocompatibilidade principal) na superfície das células.

A proteína E6 de BPV é um ativador transcricional, que interage com e inibe o coativador 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 (Tong *et al.*, 1997). Além disso, E6 interage com AP-1, um complexo adaptador *trans*-Golgi rede-específica de clatrina, e é provável que esta interação afete os processos celulares envolvendo vias de tráfego mediado por clatrina (Tong *et al.*, 1998).

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 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 e a proteína L2 corresponde a uma pequena porção do capsídeo (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. No entanto, é provável que L2 também apresente um papel importante durante a infecção. Ambas as proteínas codificam epitopos neutralizantes e, no caso de L2 de BPV-2, epitopos de rejeição tumoral (Campo, 2006; Borzacchiello & Roperto, 2008).

2.2. Ciclo viral dos papilomavírus

O ciclo de vida do papilomavírus está intimamente ligado à diferenciação epitelial, já que se replicam no epitélio escamoso estratificado da pele e mucosas (Campo, 1997; Stanley, 2001). A liberação dos vírions não envelopados depende da desintegração celular normal, tipicamente observada próxima à superfície do epitélio. A dificuldade de mimetizar a diferenciação do epitélio estratificado, em culturas de células, tem sido um desafio para o estudo do ciclo de vida desses vírus. Dessa forma, muito do que se sabe sobre a morfogênese deriva do estudo de versões recombinantes das proteínas estruturais L1 e L2 (Buck *et al.*, 2005). Além disso, o complexo ciclo de replicação dos papilomavírus dificulta a montagem de um sistema de propagação em laboratório, que permita a produção de vírions para fins vacinais (da Silva *et al.*, 2001).

O processo infeccioso inicial ocorre na camada basal do epitélio, através de microlesões e/ou abrasão, mas os primeiros sinais de transcrição do genoma viral só aparecem cerca de 4 semanas após a infecção (Buck *et al.*, 2005). No estágio inicial do ciclo viral, o vírus expressa parte dos seus genes nas camadas basais e suprabasais, replica o genoma durante a diferenciação da camada espinhosa e granular e por último expressa as proteínas estruturais nas camadas escamosas para a encapsidação do seu DNA e montagem dos vírions, que são liberados através da descamação da camada queratinizada (Figura 3). À medida que os vírus amadurecem e as partículas virais se agrupam, eles migram para células hospedeiras em direção à superfície, conseqüentemente, vírus completos são encontrados apenas nas camadas epiteliais superiores (Campo, 1997).

Uma característica interessante, apresentada pela grande maioria de tipos de PV, é a capacidade de permanecer em longos ciclos de latência. Após algum dano no epitélio infectado, possivelmente através da produção de citocinas inflamatórias e estimulação da proliferação celular, ocorre a indução da expressão dos genes virais resultando na formação do papiloma (Campo, 2006). O genoma viral pode ser

frequentemente encontrado no epitélio histologicamente normal, sem nenhum sinal clínico da doença (Ogawa *et al.*, 2004).

Apesar de serem vírus epiteliotrópicos (Campo, 2003), 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, gametas 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 (Stocco dos Santos *et al.*, 1998; Freitas *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2007).

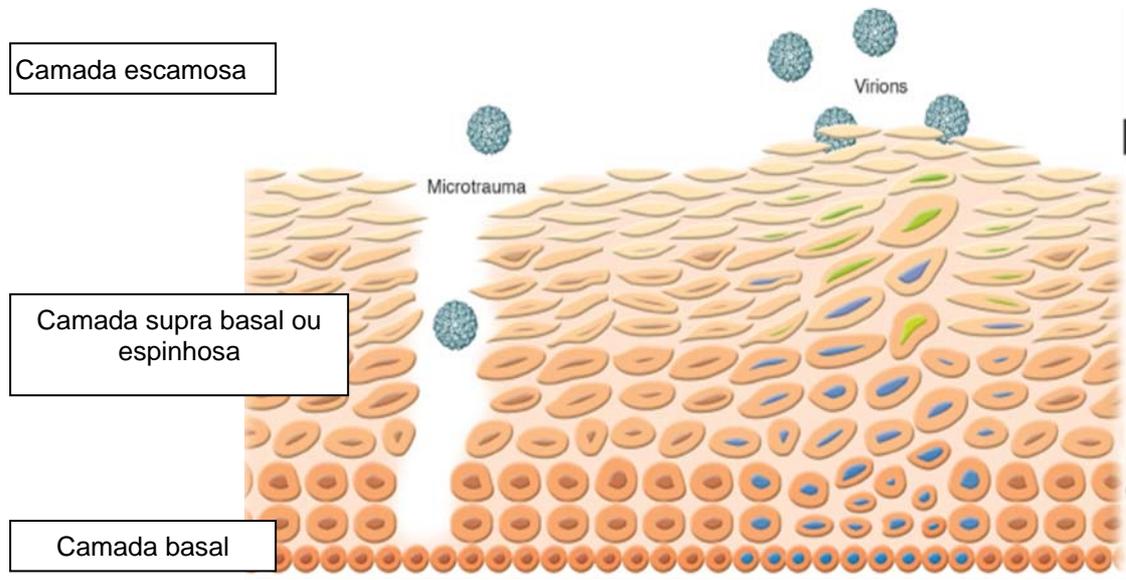


Figura 3. Ciclo de infecção do PV. Entrada do vírus no tecido epitelial através de microtrauma e estabelecimento da infecção na camada basal (células com núcleo azul). As células de núcleo verde indicam a expressão das proteínas L1 e L2 para montagem dos víriões que são liberados posteriormente (adaptado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

2.3. Papilomavírus bovino (BPV)

Seis diferentes tipos de papilomavírus bovino (BPV 1 - 6) são bem descritos e caracterizados. Originalmente os BPVs foram classificados em dois subgrupos, A e B, baseados na estrutura do seu genoma e no tipo de patologia causado. O subgrupo A formado pelos tipos 1, 2 e 5, os quais eram definidos como fibropapilomavírus por infectarem tanto o epitélio quanto a camada subdérmica formando fibropapilomas. O subgrupo B compreendia os tipos 3, 4 e 6, estritamente epiteliotrópico, infectando

somente as células epiteliais (queratinócitos) e induzindo a formação de papilomas (Jarrett et al, 1984; Campo, 2002; Campo, 2006).

Recentemente, os papilomavírus foram re-classificados seguindo a nomenclatura de Greek usada para outras famílias virais (de Villiers et al., 2004). Dessa forma, de acordo com a nomenclatura atual, que leva em consideração as propriedades biológicas e organização do genoma, os epiteliotrópicos (BPVs 3, 4 e 6) são definidos como Xi-papilomavírus, os BPVs 1 e 2 como Delta-papilomavírus e o BPV 5 é membro único do gênero Epsilon-papilomavírus (de Villiers et al., 2004). 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 sequência 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).

Ogawa et al. (2004) relataram 13 prováveis novos tipos de BPV no Japão, com base em análises de PCR. Recentemente, dois novos tipos de BPVs foram caracterizados. Análises filogenéticas baseadas na ORF 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). Outros dois tipos foram isolados de lesões no epitélio e de acordo com a organização do seu genoma e sua composição, ambos os vírus são filogeneticamente próximos ao BPV- 3, -4 e -6. Desta forma, os novos tipos são classificados no gênero Xi-papilomavírus e designados BPV-9 e BPV-10 (Hatama et al., 2008).

2.4. Papilomatose Bovina

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

A papilomatose bovina, também conhecida como verruga, figueira, verrucose, fibropapilomatose e epiteloma contagioso, é caracterizada pela presença de lesões tumorais que ocorrem na pele, mucosas e em alguns órgãos. A papilomatose bovina,

embora não caracterize um processo neoplásico, 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 e Leite, 2003).

Dependendo da intensidade das lesões, poderão ocorrer debilitação e alterações funcionais orgânicas ocasionadas pelos tumores. Infecções bacterianas secundárias podem resultar em perda de condição corporal. A supuração das verrugas traumatizadas pode resultar em dermatite necrótica. A hemorragia e miíase de verrugas traumatizadas também não são incomuns e podem resultar na morte do animal. 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 (William et al., 1992). A doença é cosmopolita e, em determinadas formas, acomete principalmente animais de até 2 anos de idade, embora todas as faixas sejam atingidas (Mello & Leite, 2003). Para a transmissão da forma cutânea, é necessário haver solução de continuidade na pele e a infecção pode se dar por contato direto (animal-animal) ou indireto (fomites).

No Brasil, a papilomatose bovina é um grave 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, podendo atingir 30% do plantel em algumas propriedades. A papilomatose cutânea geralmente está relacionada aos BPVs 1, 2, 3, 5 e 6, sendo os tipos 3, 5 e 6 restritos ao úbere (Campo, 1997; 2002).

Além da papilomatose, o gado pode apresentar processos neoplásicos derivados da malignização de papilomas pré-existentes, 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).

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 no 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) (Figura 4). O BPV 8 causa papilomas cutâneos e os BPVs 9 e 10 estão associados a papilomas no epitélio escamoso do úbere (Campo, 1997; Campo, 2002; Borzacchiello, 2008).

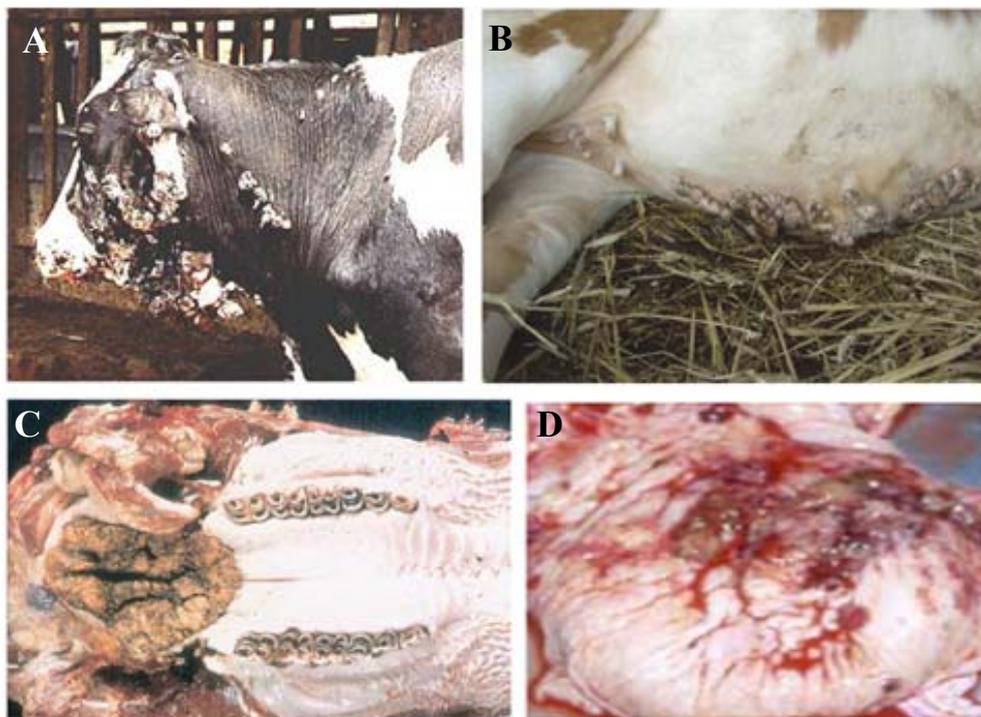


Figura 4. Representação da papilomatose bovina (A e B), câncer no trato gastrointestinal superior (C) e câncer na bexiga urinária (D) (adaptado de Campo, 2002; Borzacchiello, 2008).

As tetas e o úbere das vacas estão sujeitos 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. Uma característica dos papilomas causados pelo BPV 6 é sua expansão secundária ao redor do tumor primário, causando a impossibilidade das vacas de amamentarem seus bezerros e, além disso, os papilomas podem fechar os canais das tetas tornando o local propenso para infecção por bactérias (Campo, 1998, 2006). A Papilomatose no pênis de touros reprodutores é outro problema que interfere com as funções normais dos animais e que pode levá-los ao sacrifício (Campo, 2002).

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, rúmex 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).

Além das verrugas comumente associadas, os BPVs 1 e 2 também estão implicados em lesões neoplásicas. O BPV 2, e menos comumente o BPV 1, estão relacionados ao processo carcinogênico da bexiga urinária (Borzacchiello *et al.*, 2008). Eles estão 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 (figura 5), como a quercetina (Campo, 2002; Leal *et al.*, 2003). O DNA viral está presente nos tumores em múltiplas cópias episomais, porém não há registros da presença de partículas virais (Campo *et al.*, 1992). O animal infectado pelo BPV-2 é exposto à imunossupressores, os quais ativam os princípios mutagênicos e carcinogênicos presentes na samambaia influenciando a ativação da expressão dos genes virais, como E5 e E7, conduzindo para a transformação celular e iniciando o processo cancerígeno. Alguns eventos celulares acontecem quando o BPV 2 está associado ao câncer da bexiga urinária, como a ativação da telomerase, aumento da expressão do oncogene c-H-ras e da ciclooxigenase-2 (COX-2), assim como a ligação da proteína E5 ao receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF- β) (figura 5).

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). No entanto, até o momento não está claro o modo de transmissão, nem existe tratamento eficaz contra esta doença (Chambers *et al.*, 2003).

O sarcóide eqüino pode ser considerado como tumor fibroblástico benigno que afeta cavalos, mulas e burros, podendo 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 (Borzacchiello *et al.*, 2007). Até o momento, sabe-se que não existe prevalência de sexo para o desenvolvimento da doença, porém, os animais machos e jovens são mais afetados (Chambers *et al.*, 2003; Nasir & Campo, 2008) (Figura 6).

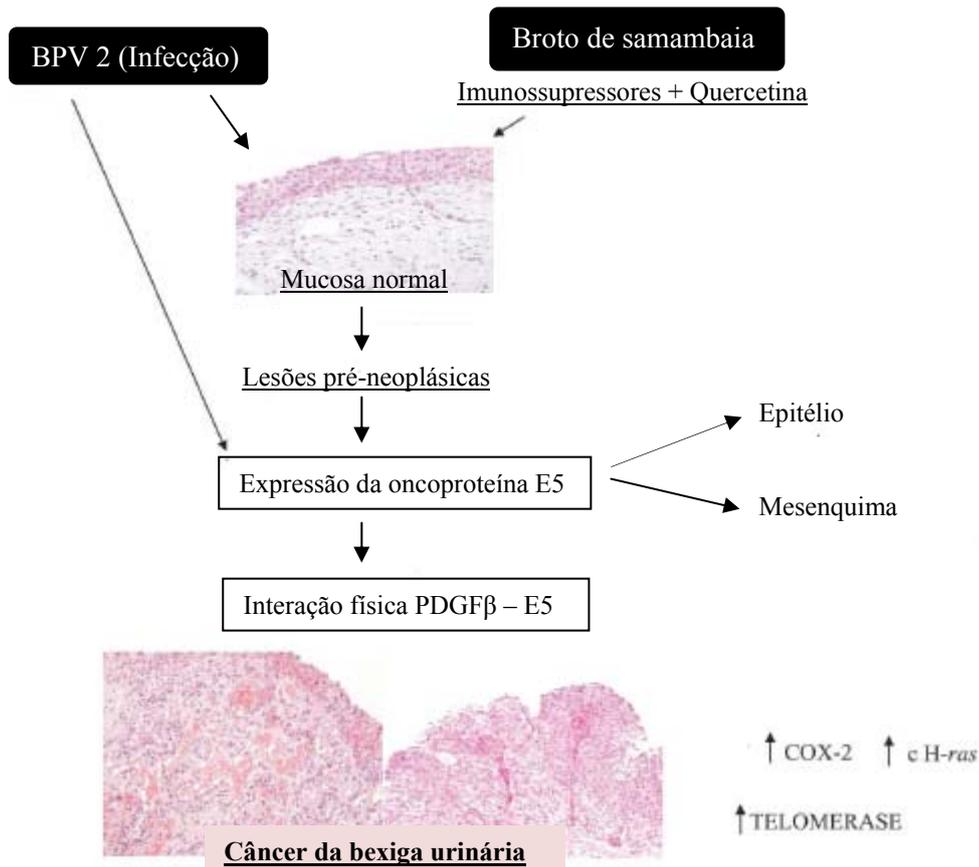


Figura 5. Representação diagramática da carcinogênese em bexiga urinária em gados que ingerem o broto de samambaia. BPV 2 infecta a mucosa da bexiga. A ligação de E5 a forma ativada do receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF β), o aumento da expressão da ciclooxigenase-2, c-H-ras e da telomerase são eventos celulares que acontecem quando o BPV 2 está associado ao câncer da bexiga urinária (Borzacchiello *et al.*, 2008).

A biologia da infecção pelo BPV-1 em sarcóide eqüinos se assemelha a do 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 da presença do DNA viral; as proteínas tardias (proteínas L) são ocasionalmente detectadas, mas não se observa partículas virais, sugerindo que a infecção é abortiva numa fase tardia (Nasir & Reid, 1999; Nasir & Campo, 2008).



Figura 6. Representação do sarcóide eqüino (adaptado de Campo, 2002)

Para o desenvolvimento de tumores malignos em bovinos, apenas a infecção viral não é suficiente e o BPV requer outros cofatores. O cofator ambiental de BPV no câncer da bexiga urinária é a presença do broto de samambaia nos pastos. Como o DNA de BPV 1 é encontrado na pele normal de eqüinos, esta infecção parece ser necessária mas não suficiente para o desenvolvimento do sarcóide. Nenhum cofator ambiental foi identificado para o desenvolvimento do sarcóide eqüino, porém o componente genético do animal parece ser decisivo para a progressão da doença (Nasir & Campo, 2008).

2.5. Resposta Imune ao Papilomavírus Bovino

A resposta imune dos bovinos ao BPV é muito pobre (Campo, 1998). Animais podem carregar tumores grandes, produzindo vírus ativamente em grandes quantidades, mas não respondem facilmente aos antígenos virais durante o curso da infecção e anticorpos anti-BPV são raramente detectados. A falha do sistema imune em reconhecer tanto o vírus infectante como a progênie viral, é devido ao fato do ciclo de vida do vírus ser restrito ao epitélio e não existir contato com o sistema imune do hospedeiro (O'Brien & Campo, 2002; Tindle, 2002).

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). Animais com tumores ulcerados e hemorrágicos têm níveis altos de anticorpos anti-BPV e uma boa resposta humoral pode ser obtida após a inoculação intramuscular de vírus purificados ou proteínas virais, confirmando que apenas quando o papiloma é danificado ou via imunização, antígenos virais entram em contato com células imunes. Em estágios tardios de infecção, pode-se observar uma resposta celular e humoral fraca, contra proteínas do capsídeo e/ou contra a proteína transformante E7, a qual parece está associada com a rejeição do papiloma (Campo, 1998).

A pobre resposta imune contra o BPV é, provavelmente, a principal razão para persistência da infecção. Até mesmo em hospedeiros imunocompetentes, os papilomas persistem por muitos meses antes que a regressão aconteça. A falta de reconhecimento pelo sistema imune, apesar de uma abundante expressão das proteínas virais, sugere que o hospedeiro fique incapacitado pela infecção causada pelo papilomavirus. Recentemente, tem se tornado claro que, além da imunoevasão passiva, devido ao ciclo de vida do vírus ser confinado ao epitélio, os papilomavírus têm desenvolvido vias ativas para esquivar-se do sistema imune do hospedeiro. Entre elas encontra-se a *down-regulation* (menor expressão) do MHC I, que evita o reconhecimento das células transformadas ou infectadas pelos linfócitos T citotóxicos (CTL), os quais são capazes de destruir as mesmas (O'Brien & Campo, 2002; Araibi et al., 2004; Ashrafi *et al.*, 2006).

O MHC I tem um papel crucial no reconhecimento imune e na liberação do vírus das células infectadas. Esta molécula é um complexo ternário formado pela cadeia pesada (HC), microglobulina $\beta 2$ e peptídeo, todos estes elementos são essenciais para formação e estabilidade do complexo. A degradação proteolítica das proteínas virais gera um espectro de peptídeos que são carregados pela cadeia pesada do MHC I no retículo endoplasmático, onde a microglobulina $\beta 2$ e chaperonas, como TAP (transportador associado ao peptídeo), são importantes para formação do complexo (Cresswell et al., 1999). O complexo MHC I é glicosilado e transportado do retículo endoplasmático, pelo aparato de Golgi, para a membrana plasmática para ser apresentado aos linfócitos T citotóxico. Portanto, MHC I desempenha um papel crítico na vigilância imune (Gromme *et al.*, 1999).

A *down-regulation* do MHC I é realizada pela ação da proteína E5 do BPV, e a regulação ocorre em vários níveis: a transcrição do gene da cadeia pesada 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). A inibição da expressão do MHC I por E5 também foi observada em papilomas induzidos por BPV, corroborando os experimentos realizados *in vitro* (Araibi *et al.*, 2004).

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 do sistema imune, incluindo os linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APC). 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 fraca das células T, resultando em uma ignorância imunológica e/ou tolerância às células infectadas (O'Brien & Campo, 2002). A ausência das moléculas de MHC I na superfície das células epiteliais previne a apresentação dos peptídeos virais para as células T efetoras, evitando a morte das células infectadas pelas CTLs. Além disso, outro mecanismo para evitar a resposta imune é a interferência na rota do interferon (IFN), o que pode favorecer o estabelecimento do vírus no início da infecção (O'Brien & Campo, 2002).

Proteínas endógenas, incluindo as proteínas virais, podem também entrar na rota do MHC classe II e serem apresentadas pelo APC para os linfócitos T CD4 (Aichinger *et al.*, 1997). Como E5 inibe o tráfego das proteínas dos endossomos precoces para o tardio (Thomsen *et al.*, 2000) e alcaliniza os endossomos (Straight *et al.*, 1995) a expressão de E5 pode também afetar a apresentação do antígeno pelo MHC II pela rota do endossomo.

Mediadores inflamatórios são liberados como resultado de um dano ao tecido produzido por algum patógeno, por exemplo, podendo assim, ativar as APCs, como as células dendríticas (células de Langerhans (LC) na pele), permitindo que estas células

possam eficientemente processar e apresentar os antígenos estranhos para as CTL. Como o ciclo de infecção dos PV é não-lítico, 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 (O'Brien & Campo, 2002; Kanodia *et al.*, 2007). No caso da infecção por BPV, a expressão da proteína E5 é capaz de afetar a apresentação do antígeno tanto pelo MHC I quanto MHC II, interferindo de forma precisa e decisiva na resposta imune do hospedeiro infectado. Desta forma, a proteína E5 se torna uma excelente ferramenta para estudos na regressão de tumores estabelecidos, através das vacinas terapêuticas.

2.6. Proteína E5 do Papilomavirus Bovino

A proteína E5 do papilomavirus bovino possui 44 aminoácidos, está localizada no aparato de Golgi e em outras membranas intracelulares; é composta por uma porção altamente hidrofóbica, compreendida entre os aminoácidos 4 a 31, e outra hidrofílica, entre os aminoácidos 32 a 44, porção C-terminal (Figura 7). E5 é encontrada na célula tanto como monômero, dímeros ou tetrâmeros, mas a forma dimérica é a mais abundante (Sparkowski *et al.*, 1996; Adduci and Schlegel, 1999). A oligomerização parece ser essencial para a atividade transformante de E5, já que mutações nas cisteínas 37 e 39, aminoácidos responsáveis pela dimerização da proteína, resultam em polipeptídeos monoméricos e sem ação transformante (Figura 8) (Adduci and Schlegel, 1999). A proteína E5 está associada à membrana em uma orientação transmembrana tipo II, com sua porção hidrofílica e C-terminal voltada para o lúmen do retículo endoplasmático ou do aparato de Golgi (Talbert-Slagle and DiMaio, 2008).

MET-PRO-ASN-LEU-TRP-PHE-LEU-LEU-PHE-LEU-GLY-LEU-VAL-ALA-ALA
¹⁷
 MET-**GLN**-LEU-LEU-LEU-LEU-LEU-PHE-LEU-LEU-LEU-PHE-PHE-LEU-VAL
³³ ³⁷ ³⁹
 TYR-TRP-**ASP**-HIS-PHE-GLU-**CYS**-SER-**CYS**-THR-GLY-LEU-PRO-PHE

Figura 7. Sequência de aminoácidos da proteína E5 de BPV. Os aminoácidos críticos para a ligação e ativação do PDGF-R e transformação celular são mostrados em negrito e enumerados (DiMaio *et al.*, 2000).

Normalmente, o PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas) liga-se na porção extracelular do receptor e induz a sua dimerização, com subsequente ativação da atividade tirosino quinase, e autofosforilação do resíduo de tirosina presente no domínio intracelular do receptor. No entanto, a proteína E5, que não possui nenhuma atividade enzimática intrínseca, é capaz de formar complexos estáveis com os domínios transmembrana e justamembrana do Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF β -R) ativando-o constitutivamente (DiMaio et al., 2000) (Figuras 8 e 9). Esta ativação também ocorre através da dimerização do receptor e da autofosforilação de múltiplos resíduos da tirosina, presentes nas duas subunidades intracelulares do receptor (Petti et al., 1991; Lai et al., 1998; DiMaio et al., 2000). O estímulo do PDGF β -R ativa a cascata de sinalização intracelular, resultando em proliferação celular (DiMaio & Mattoon, 2001). A oncogenicidade de E5 deve-se, em parte, à habilidade de induzir uma trans-fosforilação e ativar constitutivamente o PDGF β -R, mas também existem outras atividades transformantes relacionadas à mesma (Drummond-Barbosa et al., 1995; Goldstein et al., 1994; Lai et al., 1998, Suprynowicz et al., 2005; Talbert-Slagle and DiMaio, 2008). A proteína E5 liga-se e ativa a forma imatura do receptor PDGF (Goldstein et al., 1994; Petti e DiMaio, 1992; Petti et al., 1991), o que pode ocorrer no aparato de Golgi antes que o receptor seja glicosilado e transportado para a superfície celular. Outros receptores tirosino quinase, como PDGF α -R e EGF-R (Receptor do Fator de Crescimento Epidermal), foram testados, mas nenhum foi capaz de permitir a ação transformante de E5, indicando que é específica a interação de E5 com o PDGF β -R (Goldstein et al., 1994). Os principais aminoácidos envolvidos na interação de dímeros da proteína E5 com os receptores PDGF β são: o aminoácido 17 (Glutamina) da proteína E5 e a treonina (513) do receptor PDGF β (figura 9) (Adduci and Schlegel, 1999; Sparkowski et al., 1996).

O pequeno tamanho da proteína E5 sugere uma provável tolerância às mutações. Portanto, estudos recentes demonstraram que toda a porção amino-terminal – (um quarto da proteína), poderia ser substituído por outras seqüências de aminoácidos hidrofóbicos sem que sua atividade transformante fosse perdida. Análises subsequentes de mutações nos códons entre os aminoácidos 15 – 25 e de mudança completa na região central hidrofóbica da proteína, por inserção de seqüências hidrofóbicas aleatórias, reforçam essa hipótese. Os poucos aminoácidos essenciais para a proteína inclui as duas cisteínas na porção C-terminal ligadas por pontes dissulfeto, importantes para a

dimerização de E5, as glutaminas na posição 17 ligadas por pontes de hidrogênio, essencial para estabilizar o dímero de E5; e o ácido aspártico na posição 33 (DiMaio et al., 2000). Quando a glutamina 17 é substituída por uma glicina a atividade transformante da proteína E5 é extinta, já que não ocorre a ligação de pontes de hidrogênio entre as glutaminas e o dímero de E5 não pode ser formado (Figura 9) (Sparkowski *et al*, 1994; DiMaio et al., 2000). Esses dados revelam que a pequena proteína hidrofóbica pode exercer seu efeito no crescimento celular mesmo com numerosas mudanças na seqüência, contanto que os principais aminoácidos já citados sejam mantidos (Talbert-Slagle and DiMaio, 2008).

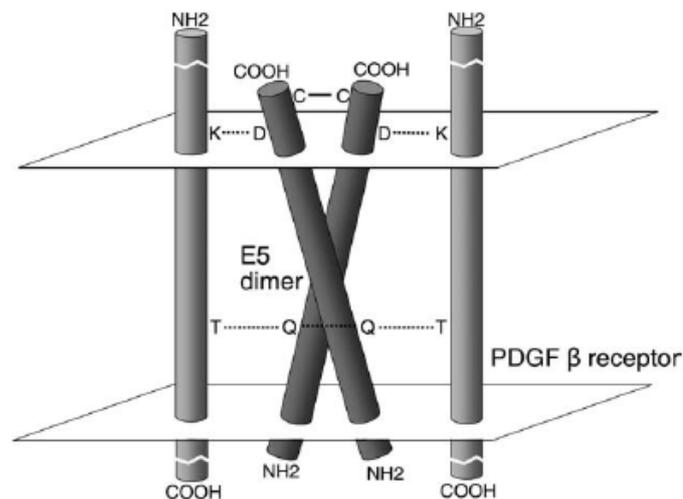


Figura 8. Esquema de um complexo entre um dímero de E5 (cilindros escuros) e duas moléculas do PDGF β -R (cilindros claros). Os dois paralelogramos brancos representam as membranas interna e externa. A linha sólida representa a ponte dissulfeto que estabiliza o dímero, e as linhas pontilhadas as pontes de hidrogênio entre a proteína E5 e o PDGF β -R e entre as glutaminas que também estabilizam o dímero. C- cisteína, D- ácido aspártico 33, K- lisina 499, Q- glutamina 17, T- treonina 513 (Talbert-Slagle & DiMaio, 2008).

A proteína E5 também liga-se à Ductina 16K/subunidade c, um componente das junções gap e da ATPase vacuolar, enzima responsável por controlar o pH do aparato de Golgi e outras organelas intracelulares. A associação entre a subunidade da ATPase e a proteína E5 parece ser mediada por interações com a glutamina 17 de E5 e o ácido glutâmico no domínio transmembrânico da ATPase (DiMaio et al., 2000). Esta interação é responsável por uma “downregulation” das junções gap e conseqüente isolamento das células infectadas de suas vizinhas (Faccini et al., 1996). A interação

com a 16K conduz também à alcalinização do endossoma e aparato de Golgi (Straight et al., 1995; Schapiro et al., 2000), levando à retenção intracelular de moléculas de MHC classe I e também a uma incorreta glicosilação da cadeia pesada da molécula MHC I (Ashrafi et al., 2002; Marchetti et al., 2002). Como muitas proteínas reguladoras importantes do crescimento, (incluindo o PDGF β -R), transitam através do aparato de Golgi até seu destino final na célula, é possível que a habilidade da proteína E5 em perturbar o pH das organelas intracelulares possa influenciar a atividade destas proteínas e contribuir para a transformação. A proteína E5 também pode associar-se com a proteína α - adaptina, a qual está envolvida no metabolismo dos receptores dos fatores de crescimento; influenciando, desta forma, na sinalização celular (DiMaio et al., 2000).

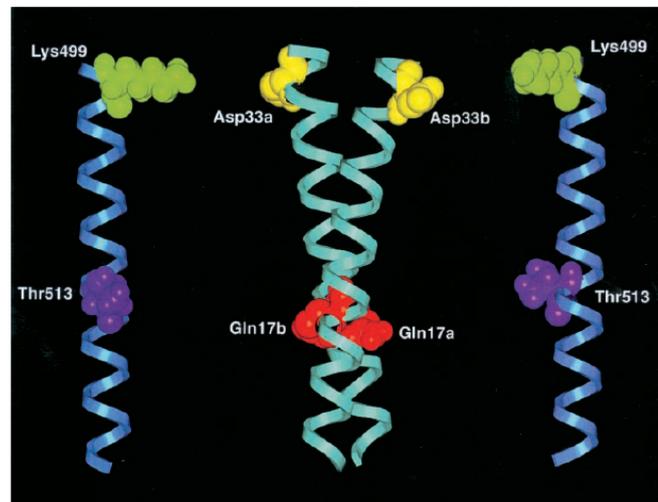


Figura 9. Modelo de interação entre o dímero da proteína E5 (hélices em azul claro) e o PDGF β -R (hélices em azul escuro). Os aminoácidos envolvidos na formação do complexo são: glutamina 17 (vermelho) da proteína E5 e treonina 513 (roxo) do PDGF-R; ácido aspártico 33 (amarelo) da proteína E5 e lisina 499 (verde) do PDGF-R (DiMaio and Mattoon, 2001).

A proteína E5 também promove a ativação de várias quinases, incluindo: ciclina A-cdk2, MAP, JNK, PI 3-K e c-Src. Desta forma, interfere no controle do ciclo celular e na cascata de transdução de sinais, contribuindo para o desenvolvimento de uma neoplasia. Fosfoinositídeo 3-quinase (PI 3-K) é uma enzima que fosforila os fosfolípídeos inositol especificamente na posição D-3 do anel do inositol. Os lipídeos fosforilados pela PI 3-k servem como segundo mensageiro envolvido na regulação do crescimento celular e diferenciação, apoptose, organização do citoesqueleto, motilidade

celular, tráfego de membrana e metabolismo da glicose. O heterodímero PI 3-K (p85/p110) realiza um papel fundamental no fator de crescimento induzido por sinais mitóticos e é importante na transformação celular pela c-Src. Quando E5 ativa constitutivamente c-Src também induz a ativação persistente do PI 3-K, através de um mecanismo que envolve o aumento da fosforilação da tirosina da subunidade regulatória (p85) do PI 3-K. A ativação do PI 3-K não requer a ativação constitutiva do c-Src ou PDGF-R, mas não é capaz de induzir transformação celular suficiente. Supryniewicz et al (2000, 2002) mostraram que tanto o E5 selvagem como os mutantes E5 transformantes que eram defectivos em ativar o receptor PDGF, ativavam constitutivamente o heterodímero (p85/p110) PI 3-K. Como foi mostrado que a ativação constitutiva do PI 3-K era capaz de induzir características celulares transformantes, é considerável que a ativação de PI 3-K contribua significativamente para a transformação dependente de E5.

A proteína E5 pode ativar Src sem a concomitante ativação do receptor PDGF. A ativação de Src parece estar ligada a atividade transformante de E5, já que Src não é constitutivamente ativo nas células que expressam o mutante defectivo em transformação, E5 Q17G.

A proteína E5 do HPV possui um tamanho (83 aminoácidos) maior que E5 de BPV e está envolvida com a replicação do vírus e a transformação celular fraca, que aparentemente é influenciada pela atividade do receptor EGF e possivelmente pela ATPase vacuolar (Genther-Williams et al., 2005). E5 está envolvida na carcinogênese, mas sua ação está restrita ao estágio precoce. A afinidade de E5 do HPV pelo receptor EGF, ao invés do PDGF-R, está ligada ao tropismo tecidual dos HPVs, os quais infectam exclusivamente as células epiteliais, um tipo celular rico em receptores EGF. Ao contrário, BPV infecta também fibroblastos e outras células mesenquimais as quais expressam de forma abundante os receptores PDGF β . Esta proteína está localizada nas membranas intracelulares incluindo aparato de Golgi e retículo endoplasmático, assim como E5 de BPV, e parece que também está localizada nas membranas nucleares. Em contraste com a ativação ligante independente do receptor PDGF β causado pelo E5 de BPV, a expressão de E5 do HPV16 afeta o metabolismo do receptor EGF. Células que expressam E5 do HPV16 exibem níveis elevados do receptor EGF na superfície celular, aparentemente como um resultado de uma redução na degradação dos receptores nos endossomos. Este processo é acompanhado pelo crescimento da reciclagem do receptor

para a superfície celular, elevando a fosforilação da tirosina do receptor (Figura 10). Assim, o efeito primário da proteína E5 do HPV não é ativar o receptor diretamente, mas sensibilizar bastante as células para que elas possam responder melhor ao EGF (Fator de crescimento epidermal) (DiMaio and Mattoon, 2001). A proteína E5 do HPV também é capaz de associar-se fisicamente com a subunidade 16 KDa da ATPase vacuolar e causar inibição da acidificação dos endossomos, o que pode ser responsável pela inibição da degradação dos receptores EGF, e aumento da reciclagem do receptor para a membrana (Straight et al., 1993) (Figura 10). No entanto, Thomsen et al. (2000) sugerem que E5 afeta o tráfego endocítico ao invés da alcalinização dos endossomos. As junções gap, que medeiam a comunicação célula-célula, também é inibida pela E5 do HPV, assim como pelo E5 de BPV. Este efeito pode deixar as células insensíveis aos sinais inibidores de crescimento enviados pelas células vizinhas. A associação entre E5 e ATPase vacuolar pode ser responsável por prejudicar a comunicação célula-célula, porque a subunidade da ATPase vacuolar parece ser um componente das junções gap na membrana plasmática (DiMaio & Mattoon, 2001). Esta proteína também causa a retenção do MHC (HLA) de classe I no aparato de Golgi e impede seu transporte para a superfície celular. Ao contrário da proteína E5 de BPV, ela não afeta a síntese da cadeia pesada do HLA classe I ou a expressão do TAP (Kim & Yang, 2006).

Nas verrugas, presentes nos bovinos, a proteína E5 de BPV é expressa nos queratinócitos epidermais assim como nos fibroblastos dermal. Além disso, a proteína E5 pode causar transformação tumorigênica em queratinócitos de murino estabelecidos. Como os queratinócitos, normalmente, não expressam o receptor PDGF, esses resultados sugerem que a transformação nessas células pode ser mediada por diferentes alvos celulares, possivelmente a ATPase vacuolar. Alternativamente, é possível que o receptor PDGF β seja expresso em níveis baixos nestas células epiteliais e que também medei a transformação celular (DiMaio & Mattoon, 2001).

Com relação ao câncer de bexiga, Borzacchiello et al. (2003) apresentaram evidências da importância da presença de BPV-2 e da expressão de E5 na progressão tumoral. A proteína E5 foi localizada principalmente no citoplasma das células basais e suprabasais. Possivelmente, estas células cancerosas escapam do controle do sistema imune devido a uma retenção das moléculas de MHC de classe I, mediado por E5.

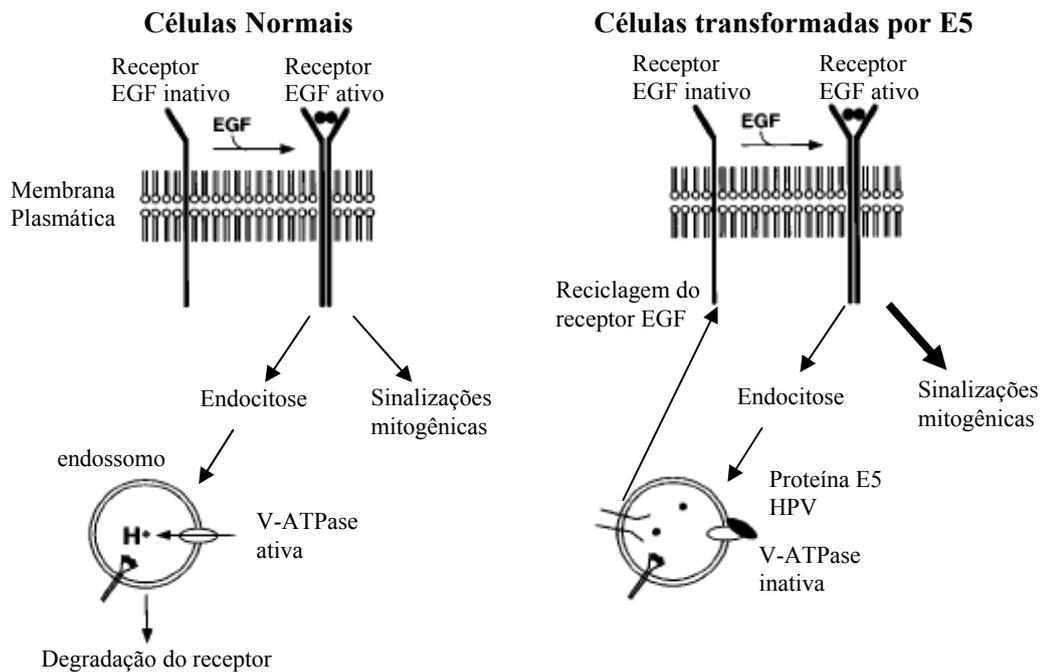


Figura 10. Modelo do efeito da proteína E5 do HPV16 na reciclagem do receptor EGF. Nas células normais, o receptor EGF ativado é internalizado e degradado nos endossomos, atenuando, assim, a sinalização. A ATPase vacuolar mantém o baixo pH requerido para degradação dos receptores. Nas células transformadas por E5, a proteína se liga diretamente na ATPase vacuolar e inibe sua atividade. Isto provoca a acidificação endossomal, resultando no aumento da reciclagem do receptor para a superfície celular e ampliação da sinalização (DiMaio and Mattoon, 2001).

2.7. Vacina de DNA

A vacinação foi comprovada nos últimos 120 anos ser o método mais eficiente e efetivo no controle de doenças infecciosas. Apesar dos grandes benefícios das vacinas existentes, há ainda muitas doenças para as quais não existem vacinas. Recentemente tem ocorrido o ressurgimento de várias doenças, principalmente nos países em desenvolvimento (Kano *et al*, 2007).

Diversas estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas. As vacinas de primeira geração foram produzidas com microrganismos vivos e atenuados, como a vacina BCG contra a tuberculose; ou mortos e inativados como a vacina contra a *Bordetella pertussis* (Bloom, 1989). As vacinas que contêm organismos vivos tendem a induzir uma imunidade mais forte que as vacinas com

organismos mortos e também não necessitam do uso de adjuvantes para aumentar a antigenicidade efetiva, o que poderia provocar reações locais severas. As vantagens das vacinas que contêm organismos mortos são a sua segurança em relação à virulência residual e a capacidade relativamente fácil de armazenar. Embora as vacinas atenuadas e vivas modificadas sejam um sucesso no controle de doenças infecciosas, sempre há necessidade de torná-las mais efetivas, baratas e seguras (Kano *et al*, 2007).

Na última década, o grande avanço da biologia molecular permitiu a introdução de novas estratégias para a obtenção e a produção de antígenos, assim como, foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune. Estas estratégias permitiram o desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. Entre estas estão as de subunidades, consideradas de segunda geração, constituídas de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais ou sintéticas, e antígenos recombinantes. Este tipo de vacina apresenta uma potente resposta humoral, porém não induz resposta celular. As vacinas gênicas (ou de terceira geração) surgiram com a introdução de genes ou fragmentos de genes, que codificam antígenos potencialmente imunogênicos, em vetores virais ou em DNA plasmidial capazes de estimular tanto a resposta imune celular quanto humoral (Rodrigues Jr et al., 2004). Os vetores virais apresentam um risco potencial e podem desencadear um processo inflamatório, já as vacinas de DNA que utilizam plasmídeos são relativamente estáveis, mas precisam ser testadas e melhoradas (Liu, 2003).

A vacina de DNA foi descrita em 1990, quando um plasmídeo contendo um gene repórter que codifica a β -galactosidase expressou a proteína codificada após a inoculação direta no músculo de camundongos (Wolff et al., 1990). Este estudo avaliou fatores que determinam a eficiência da transferência do gene e da imunogenicidade conferida pela inoculação do plasmídeo. Posteriormente, a inoculação de DNA que codifica uma proteína imunogênica do vírus influenza conferiu imunidade protetora em camundongos (Ulmer et al., 1993). A partir destes resultados, o entendimento sobre o mecanismo imunológico induzido por este tipo de vacina despertou interesse da comunidade científica.

Diversos trabalhos têm demonstrado a indução da imunidade protetora em camundongos pela imunização genética contra uma variedade de microrganismos, como vírus (Davis & McCluskie, 1999), bactérias e protozoários (Kalinna, 1997), e ainda contra o câncer (Liu et al., 2004) e algumas doenças autoimunes (Ramshaw et al.,

1997). Na medicina humana, as pesquisas com vacinas de DNA têm sido direcionadas principalmente para a AIDS, malária e tuberculose (Wang et al., 1998, Wang et al., 2005; Zhang et al., 2007). A utilização da vacinação por DNA na terapia contra tumores gerou resultados satisfatórios (Liu et al., 2004) e, recentemente, resultou no controle de crescimento de melanoma em estágio avançado (Liao et al., 2006).

Os plasmídeos usados como vacina de DNA devem conter os seguintes elementos essenciais: um promotor eucariótico forte, como o derivado do citomegalovirus (CMV), o gene de interesse, gene de resistência a antibióticos, sítios de clonagem, uma origem de replicação que permita crescimento em bactéria e incorporação das seqüências de poliadenilação, que são capazes de estabilizar os transcritos de RNA mensageiro e são importantes para a translocação deste RNA do núcleo para o citoplasma (Donnelly e Ulmer, 1999). Para a maioria das vacinas de DNA, o promotor CMV é a escolha mais comum porque apresenta níveis altos de expressão constitutiva em uma extensiva gama de células de mamíferos (Kutzler & Weiner, 2008).

O princípio da vacina de DNA é elegantemente simples. O DNA codificando um antígeno vacinal pode ser liberado no organismo por uma variedade de rotas, incluindo injeção intramuscular (IM). O DNA é incorporado às células musculares (miócitos) e/ou APC, como as células dendríticas (DC). Os DNAs que forem endocitados pelas células no sítio de inoculação permanecem no núcleo celular sem ocorrer incorporação ao genoma da célula hospedeira. As vias metabólicas da célula hospedeira são utilizadas para os processos de transcrição do DNA inoculado e, em seguida, o RNA mensageiro é traduzido para que ocorra a síntese do antígeno protéico relacionado ao agente infeccioso. Os antígenos expressos endogenamente são processados pelas APC e os fragmentos resultantes (contendo os epítomos íntegros) complexados com moléculas de classe I, que são codificadas por genes do complexo de histocompatibilidade (MHC I). Em seguida, estes peptídeos são apresentados na superfície celular para o reconhecimento e ativação específica de linfócitos T CD8 citotóxicos. Alguns dos antígenos produzidos pelas células musculares são secretados para o espaço extracelular, onde podem tanto estimular linfócitos B a produzir anticorpos específicos, como serem endocitados por outras células apresentadoras de antígenos. No processo de endocitose, os antígenos passam do compartimento extracelular para o interior das células APC e, por este motivo, são considerados antígenos exógenos e assim

processados em compartimentos celulares diferentes daqueles realizados quando o antígeno é originado dentro da célula. Os fragmentos de antígenos exógenos são complexados com moléculas MHC classe II e apresentados na superfície das células apresentadoras para o reconhecimento e ativação de linfócitos T CD4 auxiliares. As vacinas de DNA são, portanto, capazes de induzir ambos os tipos de imunidade protetora, humoral e celular, com a estimulação de linfócitos T CD4+ e T CD8+, sem alguns dos possíveis riscos associados às vacinas com organismos vivos (Dunham, 2002; Henke, 2002) (Figura 11). Após o processamento e apresentação de antígenos pelas APCs, são produzidas citocinas, como a IL-12, que estimula a diferenciação das células T virgens em Th1 efectoras. Por sua vez, as células Th1 produzem citocinas como o IFN- γ que pode atuar na célula alvo que possui o transgene (Oliveira et al., 1998; Nagata et al., 2004) e melhorar a expressão de moléculas de MHC classe II pelas células apresentadoras de antígenos, facilitando a apresentação do antígeno e a ativação da célula T.

As vacinas de DNA oferecem uma série de vantagens quando comparadas às vacinas clássicas, em termos econômicos e técnicos. O tempo para a produção da vacina de DNA é rápido, o custo de produção em larga escala é consideravelmente menor ao custo de produção das vacinas compostas de fração subcelular e peptídeos sintéticos (Whalen, 1996, Robinson, 1997). Trata-se de uma vacina altamente reproduzível e tanto a produção quanto o isolamento pode ser realizado em larga-escala, otimizando o tempo de produção e custo. Pequenas doses são efetivas em modelos animais, os vetores plasmidiais são simples de manipular e pode ser testado rapidamente. O controle de qualidade é mais fácil, a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração, pois estas vacinas são estáveis à temperatura ambiente e podem ser liofilizadas (Waine & McManus, 1995). Estes fatores facilitam o transporte, a distribuição e o estabelecimento de amplos programas de imunizações em regiões de difícil acesso, o que seria interessante para a realidade brasileira e de outros países em desenvolvimento (Azevedo et al., 1999, Glenting & Wessles, 2005).

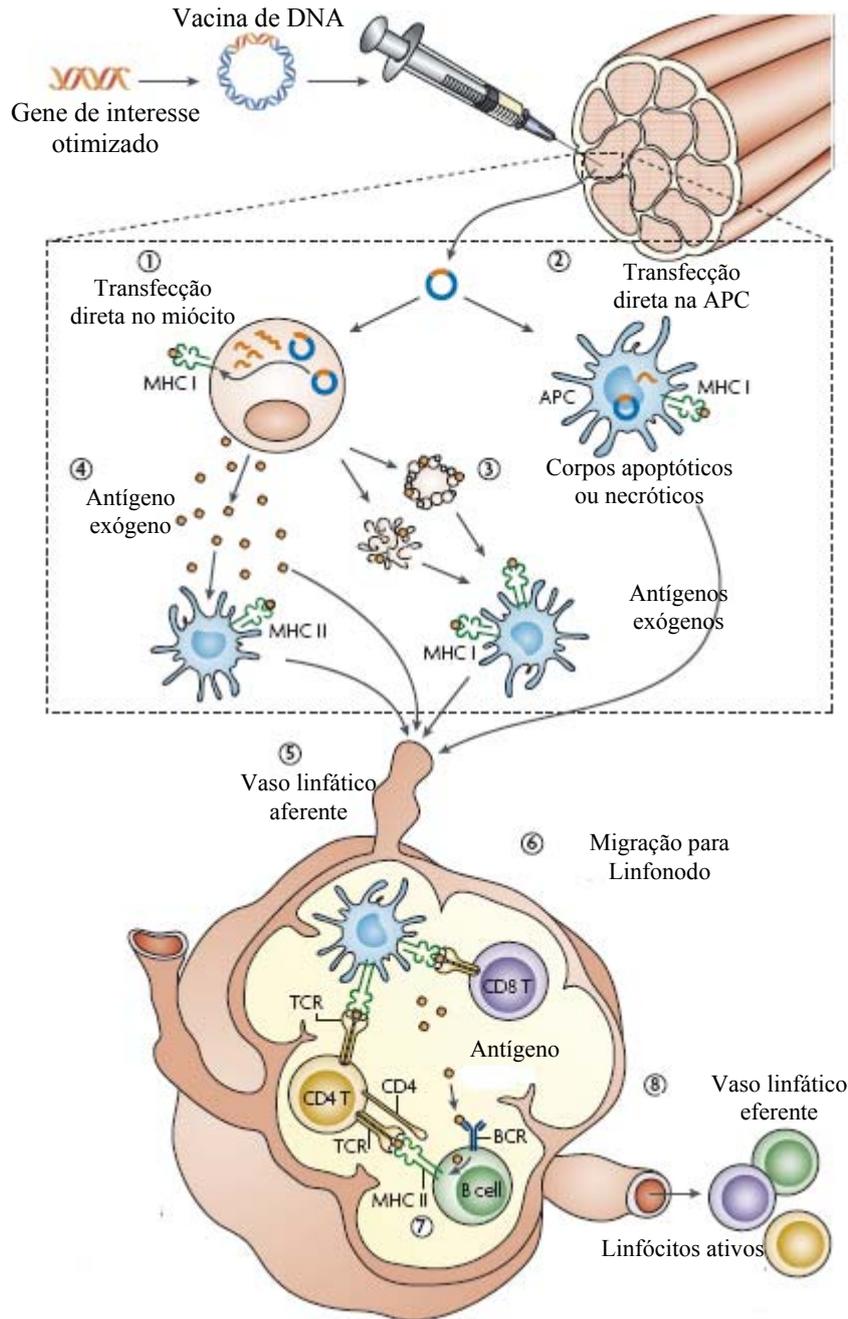


Figura 11. Indução da imunidade humoral e celular pela vacina de DNA. O plasmídeo entra no núcleo dos miócitos ou APC, utiliza a maquinaria celular para transcrição do gene seguida da expressão da proteína no citoplasma e conseqüentemente a formação dos antígenos protéicos. APC apresenta o antígeno através do MHC I pela transfecção direta (2) ou através da fagocitose de corpos apoptóticos de células transfectadas (3). APC também exibem o antígeno pelo MHC II quando endocitam o antígeno exógeno (4) liberados pelas células transfectadas. APCs carregada com o antígeno migra para o linfonodo pelo vaso linfático aferente (5) onde apresenta o peptídeo para as células T inativas via MHC e receptor do linfócito T (TCR). Esta interação provê os sinais secundários para iniciar uma resposta imune, ativar e ampliar as células T ou, alternativamente, ativar as células B e cascata de produção de anticorpo (Kutzler & Weiner, 2008).

No caso de indivíduos imunocomprometidos, um grupo com alto risco de desenvolver uma doença, a vacina de DNA seria interessante, pois uma vacina comercial como, por exemplo, contra a tuberculose (BCG) é contra-indicada (Whalen, 1996). Em crianças e idosos, cujo sistema imunológico se apresenta imaturo ou deficiente, a avaliação da vacina de DNA não apresentou os riscos proporcionados pelas vacinas vivas atenuadas (Siegrist, 1997).

A imunidade adquirida pela vacina de DNA persiste por longo período de tempo, devido à constante produção endógena do antígeno pela célula hospedeira e à capacidade destes antígenos estimularem linfócitos de memória imunológica (Snadeep et al., 1996). O sucesso da imunização com DNA depende, principalmente, da natureza dos antígenos, da frequência e via de administração, da concentração de DNA administrada, da localização celular do antígeno codificado pelo plasmídeo (secretado, ligado à membrana ou citoplasmático), da idade e saúde do hospedeiro e da espécie dos animais vacinados (Rainczuk et al., 2003; Morel et al., 2004; Robinson, 1997; Fyan et al., 1993).

Os riscos que podem ser gerados com vacinas de DNA, como, a integração do plasmídeo ao genoma hospedeiro, gerando mutagênese pela ativação de protooncogenes ou pela inativação de genes supressores de tumor, estão sendo avaliados. Estudos têm mostrado baixa probabilidade de ocorrer integração do plasmídeo. Três diferentes vacinas de DNA contendo genes virais foram avaliadas em camundongos, e se a integração tivesse ocorrido, a frequência seria de oito integrações do DNA por células diplóides. Isto seria três vezes abaixo da frequência de mutação espontânea. Contudo, ensaios de integração são necessários para todos os DNA plasmidiais que serão usados em vacinas para uso clínico. Outros riscos incluem a indução de tolerância, devido à apresentação do antígeno em longo prazo, ou reações auto-imunes devido à indução de anticorpos anti-DNA. Os níveis destes anticorpos têm aumentado de 20-30% em seres humanos, mas não induzem qualquer doença com os títulos apresentados, ao contrário do aumento de 100-1000 vezes detectado em pacientes com doenças autoimunes (Henke, 2002).

A administração da vacina de DNA utilizando a inoculação direta do plasmídeo pelas vias intratraqueal, intravenosa, intrabursal, intraorbital, intradérmica, intramuscular, oral, subcutânea e via mucosa demonstraram sucesso na indução da resposta imune em todas as vias testadas (Fynan et al., 1993; Ulmer et al., 1997;

Uchijima et al., 1998; Ren et al., 2002; Yoshida et al., 2000; Cong et al., 2005, Li et al., 2006). Entretanto, algumas vias influenciam diretamente na imunogenicidade da vacina. Os níveis de expressão dos antígenos obtidos pelas diferentes vias de administração parecem estar relacionados com a quantidade de células transfectadas obtidas após administração dos plasmídeos. A via intramuscular e a intradérmica liberam o DNA plasmidial no meio extracelular, localização pela qual, a maioria do DNA é rapidamente degradada pelas nucleases (Levy et al., 1996). Diferentemente, o sistema bio-balística (*gene gun*) libera o DNA dentro das células amenizando a perda inicial. Nos trabalhos preliminares avaliando as vias de administração da vacina, foi necessária uma concentração de DNA pela via intramuscular 100 vezes maior que o sistema bio-balística para proporcionar uma resposta imune equivalente (Pertmer *et al*, 1995; Robinson, 1997). Esta estratégia vacinal é bastante eficaz para atingir as células dendríticas, que são as células apresentadoras de antígenos mais potentes e especializadas em ativar os linfócitos T CD8 e CD4 (Condon *et al*, 1996; Porgador *et al*, 1998; Lin *et al*, 2006).

O sistema bio-balística utilizado para vacinas de DNA foi avaliado em bovinos, eqüinos, suínos, caninos e em aves (Fyan et al., 1993; Macklin et al., 1998; Vanrompay et al., 1999). Em galinhas, a bio-balística foi o sistema mais eficiente para a liberação da vacina de DNA para influenza (Fynan et al., 1993). Em perus, a combinação das vias intramuscular e intranasal induziram equivalente proteção contra a *Clamidia psittaci* comparada à liberação obtida pela bio-balística (Vanrompay et al., 1999). Por outro lado, em suínos as imunizações pela via intramuscular da vacina de DNA contra peste suína clássica induziram mais altos títulos de anticorpos do que pelo sistema de bio-balística (Andrew et al., 2000). Assim, a eficácia da vacina de DNA varia com diversos fatores que podem influenciar nestas vias de administração, como vetor, adsorção às partículas, a espécie animal e o patógeno.

Além dos sistemas já citados temos, também, a eletroporação, o qual se trata de administração de pulsos elétricos de baixa voltagem, resultando na criação de poros passageiros nas membranas e aumentando a possível entrada do DNA. A eletroporação pode ser utilizada em tecidos humanos e sua aplicação, independente do local, favorece transfecção eficiente em uma variedade de células, inclusive APC. Além disso, como um mecanismo adicional, um dano moderado ao tecido, induzido pela eletroporação, poderia provocar um fluxo de APC, sinais de perigo e aumento na liberação de

antígenos pelas células lesadas, aumentando a apresentação dos antígenos (Prud'homme, 2005).

Em alguns casos, a vacina de DNA tem falhado na produção mensurável de anticorpos, mesmo quando o hospedeiro está protegido, sugerindo que a maior estratégia utilizada é a resposta imune celular (Seo et al., 1997; Kodihalli et al., 2000).

Algumas alterações nos vetores têm sido realizadas para melhorar a potência da vacina, como modificações para aumentar a eficiência do promotor, utilização de sequência líder alternativa e otimização de códons. Sabe-se que para melhorar a eficiência da vacina de DNA é preciso aumentar a expressão do antígeno dentro da célula do hospedeiro, o que é possível através da otimização de códons (Ko *et al*, 2005).

Apesar da redundância do código genético, vários códons composto por três nucleotídeos podem codificar o mesmo aminoácido, existem disparidades espécies - específicas em uso de códons e freqüentemente são citadas como a causa para fracassos na expressão dos genes recombinantes (Angov *et al*, 2008). Tais fracassos incluem falta de expressão ou a expressão de proteína que é não-funcional ou proteína truncada devido à proteólise ou terminação prematura de tradução. A otimização de códons é uma estratégia eficiente para evitar as limitações do conteúdo celular de RNA (Ácido Ribonucleotídico) transportador (tRNA) com códons virais e bacterianos, uma vez que os requerimentos para a tradução do RNA mensageiro (mRNA) do patógeno são diferentes das células do hospedeiro (Rai & Padh, 2001; Kutzler & Weiner, 2008). Zhou et al (1999) demonstraram que os tRNA disponíveis na célula de mamífero influenciavam a tradução da proteína L1. Restrições na expressão de proteínas devido à divergência dos códons preferenciais dos genes humanos foram verificados nos genes do vírus Epstein-Barr (Karlin *et al*, 1990), no gene *env* (Hass *et al*, 1996; Wang *et al*, 2005), gp120 (André *et al*, 1998; Haas *et al*, 1996) e gp160 do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), e nos genes do capsídeo L1 e L2 do BPV 1 (Zhou *et al*, 1999) . Em todos os casos, genes sintéticos com as alterações de códons específicos para células de mamíferos, tiveram um aumento na expressão das proteínas. Também foi observado aumento da expressão das proteínas E6 e E7 do HPV16 (Zhou et al., 1999; Cid-Arregui et al., 2003; Lin et al, 2006), assim como uma forte resposta imune celular T CD8, e conseqüentemente um acréscimo da imunogenicidade das vacinas de DNA HPV16E6 e HPV16E7. Estes resultados demonstram que a otimização de códons aumenta a expressão das proteínas de interesse, assim como, a imunogenicidade das

vacinas de DNA, o que torna uma alternativa bastante promissora na prevenção e controle de neoplasmas associados à HPV.

Parece provável que a divergência na utilização dos códons, resultando em uma ineficiente expressão de proteínas viróticas, foi resultado de uma pressão seletiva para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Cid-Arregui *et al.*, 2003).

A vacina de DNA é bastante efetiva para a indução de imunidades humoral e celular num grande número de modelos animais, como os exemplos vistos em ovinos (Chandrachud *et al.*, 1995; Candido *et al.*, 2003), suínos (Gerdtts *et al.*, 1997), caninos (Suzich *et al.*, 1995) e coelhos (Sundaram *et al.*, 1997; Han *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2002), entre outros. No caso de bovinos há estudos envolvendo Vírus da Herpes Bovina tipo 1 (BHV-1), Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV) e Vírus da Diarréia Bovina (BVDV) (Schrijver *et al.*, 1997).

Os modelos animais são importantes para o estudo da interação entre o PV e seu hospedeiro e entre os co-fatores ambientais, além de serem extremamente essenciais para o desenvolvimento de vacinas antivirais, estas vacinas podem prevenir ou mesmo curar infecções com papilomavírus no estágio inicial, o que reduz a incidência de câncer e beneficia o tratamento das papilomatoses recorrentes. As vacinas de “primeira geração” baseadas em partículas virais inativadas, até as mais recentes vacinas de DNA, mostraram em modelos animais que a vacinação contra o papilomavírus é possível e efetiva tanto para efeitos profiláticos quanto para fins terapêuticos (Campo, 1997; Schiller & Lowy, 2001). Portanto, o desenvolvimento de vacinas contra papilomavírus de animais proporciona um modelo para o surgimento de vacinas contra o HPV.

Uma estratégia vacinal dirigida para a prevenção do sarcóide equino e da papilomatose cutânea e câncer de bexiga em bovinos, causados pelo BPVs 1 e 2, é muito importante, entretanto, como existem muitos animais já infectados e afetados pela doença, uma proposta terapêutica se torna necessária e muito aguardada pelos criadores. Por isso, será de grande importância a elaboração de uma estratégia baseada na imunização genética utilizando E5, a principal proteína dos BPVs 1 e 2, relacionada à transformação celular (Chambers *et al.*, 2003). Além da importância econômica do controle da infecção por BPV no contexto da pecuária nacional, este sistema também é um excelente modelo para o estudo de estratégias vacinais terapêuticas aplicadas a infecção pelo HPV em humanos.

3. OBJETIVOS

GERAL

Construir um vetor gênico, baseado no plasmídio pCI-neo usando o gene E5 otimizado dos BPVs 1 e 2, e a expressão em células de mamíferos.

ESPECÍFICOS

1. Construção do gene E5 otimizado dos BPVs 1 e 2;
2. Subclonagem do gene E5 otimizado no vetor de expressão vacinal pCI-neo, gerando a construção pCIE5sint B1/B2;
3. Transfecção em cultura de células 293 com as construções vacinais pCIE5sint B1/ B2;
4. Análise da expressão do gene E5 nas células 293 transfectadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. CONSTRUÇÃO DO GENE SINTÉTICO E5

As seqüências codificadoras da proteína E5 de BPV 1 e BPV 2, apresentam 44 aminoácidos e foram identificadas no banco de dados NCBI (número de acesso NC_001522.1 e M20219.1). A otimização foi realizada com base no “codon usage” para célula de mamífero pela empresa Epoch biolabs (USA). Todas as construções foram desenhadas para expressar o epítipo AU1 na porção N-terminal, afim de facilitar a detecção imunológica (Lim et al., 1990). Também acrescentamos a seqüência consenso Kozak e sítios para as enzimas de restrição XhoI e NotI, que flanqueiam o gene e permitem a construção do vetor através da estratégia de subclonagem. O gene foi sintetizado pela Epoch Biolabs (USA) e clonado no vetor pBlueScript.

4.2 PREPARO DE CÉLULAS COMPETENTES E TRANSFORMAÇÃO

Células *Escherichia coli* DH5 α foram transformadas, pelo sistema de cloreto de cálcio (Sambrook *et al*, 1989), com o plasmídeo pBlueScript contendo o gene E5 otimizado (pBlueScriptE5B1/B2). A linhagem a ser transformada foi inoculada em 25 mL de meio Luria-Bertani (LB) (Extrato de levedura 0,5%; Peptona de caseína 1%; NaCl 1%; Água destilada) para crescimento por 16 horas a 37°C, com agitação. Após este período, realizou-se o pré-inóculo com 1 ml da cultura em novo erlenmeyer contendo 25ml de LB para crescimento a 37°C, com agitação até atingir uma DO A600 de 0,5. A cultura foi centrifugada a 4000rpm por 5 min, a 0°C. O pellet obtido foi ressuspendido em 10ml de solução gelada de CaCl₂ (100mM) e incubado no gelo por 30min. Nova centrifugação a 4000rpm por 5 min foi realizada para ressuspensão das células em 2,5ml de solução CaCl₂ 100mM, com adição posterior de 600 μ l de glicerol. Aliquotas de 200 μ l de células competentes foram armazenadas em freezer -80°C.

Para a transformação, 10ng de DNA e 100 μ l das células competentes foram incubados no gelo por 30min com posterior choque térmico a 42°C por 2 min. Após 5 min no gelo foi acrescentado 800 μ l de LB para recuperação das células por 1 hora a 37°C. Para o plaqueamento, as células foram centrifugadas por 10 min a 1200 rpm, descartando-se 600 μ l e homogeneizando-se o pellet obtido nos 200 μ l. Placas com LB +

ampicilina (50µg/ml) foram semeadas com 200µl das células e deixadas a 37°C, por 16-24 horas para crescimento dos transformantes.

4.3. MINI-EXTRAÇÃO PLASMIDIAL

Para extração plasmidial foi usado o protocolo de Sambrook, 1989. A cultura foi crescida a 37°C em 20 ml de meio LB + ampicilina (50µg/ml), por 16 horas. Após este período foram feitas quatro centrifugações da cultura em tubo de 1,5ml, por 1min, 4°C a 14000rpm. Depois de obtido o pellet bacteriano, o mesmo foi ressuscitado em 100µl da Solução I gelada (glicose 50mM, Tris-HCl 25mM pH 8, EDTA 10mM pH 8) para dispersão em vórtex e posteriormente, misturado por inversão com 200µl da Solução II (NaOH 0,2N e SDS 1%) para lise das células. A Solução III (acetato de potássio 5M, ácido acético glacial e água destilada) foi adicionada (150µl), para precipitação de proteínas e DNA genômico, no tubo que foi mantido no gelo por 3-5min. Logo após, realizou-se uma centrifugação a 14000rpm, por 5 min, a 4°C para recuperação do sobrenadante em um novo tubo. Foram acrescentados 2 volumes de etanol absoluto a temperatura ambiente e centrifugado a 14000rpm, 10min. Foi realizada remoção do sobrenadante e obtenção do pellet, que foi adicionado de 1 ml de etanol 70% gelado para lavagem através da centrifugação por 5-10min. Após remoção do sobrenadante e secagem do pellet na estufa (37°C), ele foi ressuscitado em 50µl de água MilliQ, contendo RNase (20µg/ml), incubado por 1 hora a 37°C. O material assim obtido foi mantido a -20°C até sua utilização.

Os recombinantes foram analisados quanto à presença da construção pBlueScriptE5B1/B2, através de miniprep e digestão com enzimas XhoI e NotI (Promega) que libera o gene E5, fragmento de aproximadamente 175pb. Uma vez reconhecidos os clones realizou-se um novo inóculo, desta vez, para mini extração plasmidial para fins de subclonagem no vetor pCI-neo, utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

4.4. SUBCLONAGEM DO GENE E5 EM VETOR DE EXPRESSÃO pCI-neo

O gene E5 foi devidamente liberado do vetor pBlueScript após a digestão dupla de 4 horas a 37°C com as enzimas de restrição *XhoI* e *NotI* (20U/µl, Promega) e, em seguida, purificado pelo uso do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*

(Promega). Paralelamente, o vetor pCI-neo foi também digerido com as duas enzimas acima citadas na expectativa de linearizar e disponibilizar os dois sítios para posterior ligação com o inserto E5, como esquematizado na figura 12. As concentrações dos reagentes utilizados nas duas digestões estão representadas na tabela 01. Os produtos purificados foram ligados com uso da enzima T4 ligase (Promega), após incubação de 1 hora a 24°C, seguindo as concentrações descritas na tabela 02. Esta ligação gerou a construção pCIE5sint B1/B2.

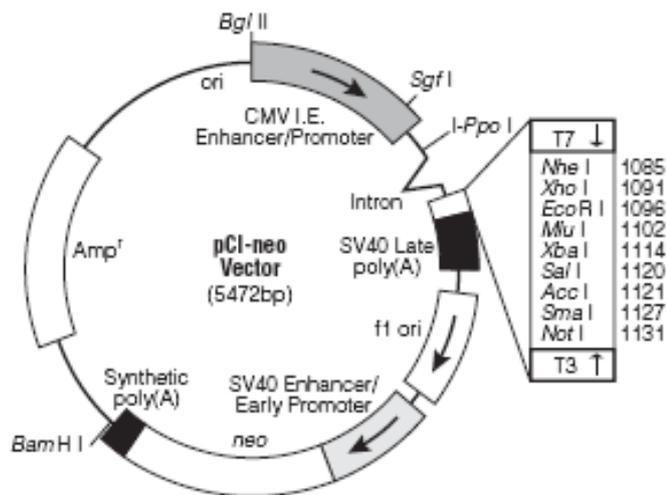
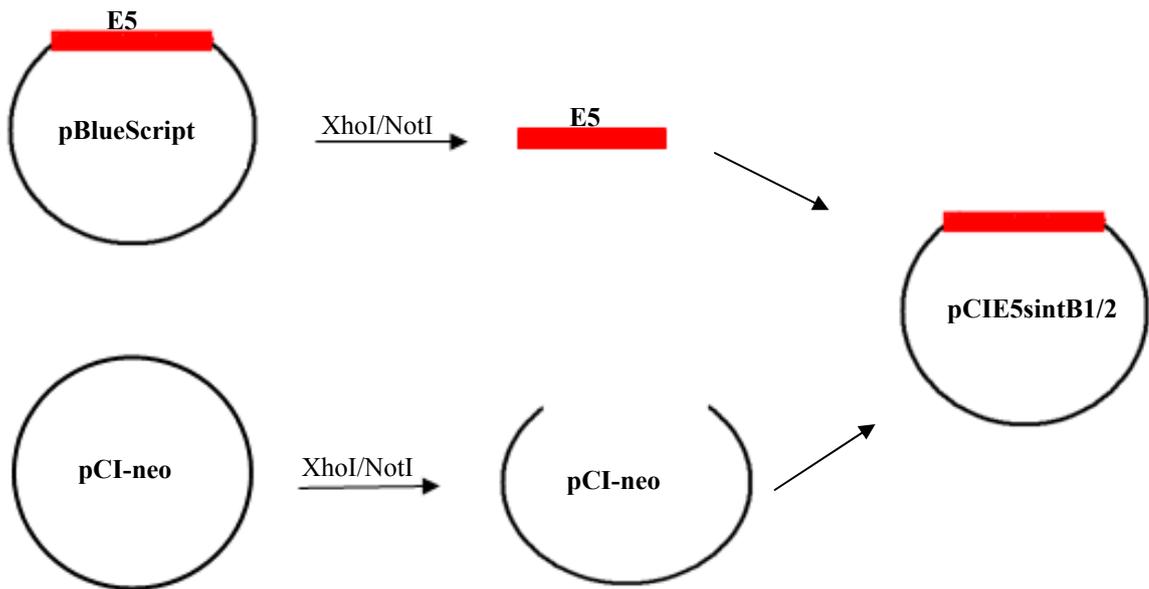


Figura 12. Esquema da digestão dupla com as enzimas XhoI e NotI do pBlueScriptE5sint e pCI-neo (Promega).

Tabela 01: Reação de digestão do pBlueScriptE5B1/B2 e pCI-neo

| Reagente | Volume | Reagente | Volume |
|----------------------------|--------|----------------------|--------|
| pBlueScriptE5B1/B2 (100ng) | 8µL | Vetor pCI-neo (50ng) | 8µL |
| Enzima XhoI 20u/µL | 1µL | Enzima XhoI 20u/µL | 1µL |
| Enzima NotI 20u/ µL | 1µL | Enzima NotI 20u/ µL | 1µL |
| Tampão 10x | 2µL | Tampão 10x | 2µL |
| BSA | 0.2 µL | BSA | 0.2 µL |
| Água | 7.8µL | Água | 7.8µL |
| Total | 20 µL | Total | 20 µL |

Tabela 02: Reação de ligação do vetor pCI-neo e fragmento E5

| Reagente | Volume |
|-------------------------|--------|
| Vetor pCI-neo (50ng) | 5µL |
| Fragmento E5(100ng) | 1.5µL |
| Enzima T4 ligase 10u/µL | 1µL |
| Tampão 10x | 2µL |
| Água | 10.5µL |
| Total | 20 µL |

O produto da ligação foi usado como agente transformante de células de *Escherichia coli* linhagem DH5α, previamente tratadas segundo o protocolo de preparo de células competentes. Após o procedimento de transformação, já descrito em etapas anteriores, as células foram plaqueadas em meio sólido LB.

A análise dos clones foi feita através de extração plasmidial utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), digestão com as respectivas enzimas de restrição, PCR (*Polymerase Chain Reaction* – “Reação em Cadeia da Polimerase”) e sequenciamento. Para detecção do inserto, foram utilizados *primer forward* que parecia no pCI-neo e o *primer reverse* que parecia na porção interna do gene, gerando um fragmento de 190pb (Tabela 04). A análise da orientação deste inserto também foi feita através da PCR usando *primer forward* que parecia na região vetor-inserto e o *primer reverse* que parecia no pCI-neo, originando um fragmento de 280 pb (Tabela 05). As duas PCRs seguiram as concentrações e condições descritas na tabela 03.

Tabela 03: Reação de PCR para os *primers* de detecção e orientação do fragmento E5

| Reagente | Volume |
|------------------------------|-------------------|
| DNA | 5µL |
| <i>Primer forward</i> (10µM) | 1.5µL (0.6 µM) |
| <i>Primer reverse</i> (10µM) | 1.5µL (0.6 µM) |
| Tampão 10x | 2.5µL (1X) |
| MgCl ₂ (50mM) | 0.5µL (1mM) |
| Taq comum (5U/µL) | 0.2 µL (0.04U/µL) |
| dNTP (2mM) | 0.5µL (40 µM) |
| Água | 12µL |
| Total | 25 µL |

Descrição do programa usado no termociclador: Desnaturação inicial a 94°C por 1'; 35 ciclos de 94°C por 20'', 50°C por 40'' e 72°C por 30''; extensão final a 72°C por 2'.

Tabela 04: Seqüência dos *primers* utilizados para detecção do fragmento E5.

| Primer | Seqüência 5' - 3' |
|---------------------------|--------------------------------|
| <i>Forward</i> pCI-neo | 5' TTTGCCTTTCTCTCCACAGG 3' |
| <i>Reverse</i> Interno E5 | 5' AAGAGTAAGAACAGTAATAGCAGC 3' |

Tabela 05: Seqüência dos *primers* para verificação da orientação do fragmento E5.

| Primer | Seqüência 5' - 3' |
|-----------------------------|--------------------------------|
| <i>Forward</i> pCI-neo – E5 | 5' ATAGGCTAGCCTCGAGGCCACCAT 3' |
| <i>Reverse</i> pCI-neo | 5' GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC 3' |

4.5. SEQUENCIAMENTO DE DNA

A construção pCIE5sintB1/B2 foi submetida a reação de sequenciamento utilizando-se *primers Forward* pCI-neo e *Reverse* pCI-neo, como descrito na tabela 06. Os *primers* pareiam no vetor pCI-neo, na região que flanqueia o gene de interesse, permitindo a verificação da matriz de leitura do inserto.

As amostras foram sequenciadas no Núcleo Integrado de Tecnologia (NIT) do CPqAM, utilizando o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões previamente estabelecidos nesta unidade.

Tabela 06: Seqüência dos *primers* para sequenciamento do plasmídeo pCIE5sintB1/B2.

| Primer | Seqüência 5' - 3' |
|------------------------|------------------------------|
| <i>Forward</i> pCI-neo | 5' TTTGCCTTTCTCTCCACAGG 3' |
| <i>Reverse</i> pCI-neo | 5' GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC 3' |

4.6. CULTIVO E TRANSFECCÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Células eucarióticas 293 (HEK-293 – Human embryonic kidney cell – Célula embrionária de rim humana) foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Invitrogen®) acrescido de: 10% soro bovino fetal (Gibco®); 1% penicilina/estreptomicina (Gibco®); 1% L-glutamina (Sigma®) – DMEM completo. Após as células atingirem uma confluência de aproximadamente 80%, foram transfectadas em placa de cultura de 6 poços com 4µg do vetor pCI-E5sintB1/B2 e 12µg do TransFast™ Transfection Reagent (Promega), de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante, com exceção da retirada do reagente de transfecção após 1 hora de incubação (37°C /5% de CO₂). Em seguida foi acrescido meio DMEM completo para a manutenção celular e incubado 48 horas (37°C /5% de CO₂). As células foram também transfectadas com a mesma quantidade de DNA, utilizando o plasmídeo pCI-neo vazio, como controle negativo, e como controle positivo da transfecção, o gene repórter da β-galactosidase.

As células transfectadas com o plasmídeo contendo o gene repórter foram incubadas (48 horas /37°C /5% de CO₂) e processadas para a avaliação da eficiência de transfecção, pela atividade de expressão do gene repórter. Para a reação de coloração do β-gal, as células foram inicialmente lavadas duas vezes com 2 ml em 1X PBS (Phosphate-buffered saline, Dulbecco) e fixadas em 1ml de solução 0.2% glutaraldeído por 5 min. Nova lavagem com 1X PBS foi realizada, e em seguida, as células fixadas foram incubadas em um volume final de 1ml de uma solução contendo: 20mg de X-Gal; 0.005M de ferriciana de potássio; 0.005M de ferrociana de potássio; 0.002M de MgCl₂ em 1X PBS, para o desenvolvimento de coloração pela atividade de β-gal. A incubação foi de 2 horas a 37°C/5% de CO₂.

4.7. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E5

4.7.1 Extração de RNA total das células 293 transfectadas

As células foram cultivadas em placa de 6 poços e transfectadas nas condições já descritas. Dois poços continham o controle negativo da transfecção (apenas com as células 293), outros dois o vetor vazio pCI-neo e mais dois, o pCIE5sintB1/B2. As duas primeiras situações foram utilizadas como controle negativo. Após 48 horas da

transfecção, o meio DMEM foi retirado e o material restante lavado 1X com 1ml de PBS estéril. Em seguida, foi acrescentado 500µl de tripsina e incubado por 30 segundos a 37°C. Para inativação da tripsina foi acrescentado 1 ml de meio DMEM completo e o volume referente aos dois poços de cada situação foram transferidos para tubo falcon 15ml e centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos. O pellet foi guardado a -80°C para posterior extração.

A extração foi realizada de acordo com as instruções do RNeasy Mini kit (Qiagen). Todas as amostras foram tratadas com DNase I (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

4.7.2 Síntese de cDNA e RT-PCR

A construção do cDNA foi realizada a partir do kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega). As amostras, controle negativo da transfecção, pCI-neo e pCIE5sintB1/B2, foram preparadas em duplicata, adicionando 4µl de RNA de cada amostra, juntamente com 1µL do *primer* oligo DT 15 (Promega), incubados à temperatura de 70°C, por 5 minutos e no gelo, por 5 min. Para controle negativo do *primer* foi preparada uma amostra com 4µl de água livre de RNA e 1µL do *primer* oligo DT 15. A reação para a transcrição reversa, na presença da transcriptase reversa, e na sua ausência (controle negativo), está descrita na tabela 07.

Tabela 07: Reação para a transcrição reversa e controle negativo.

| Reagente | Volume | Reagente | Volume |
|-------------------------|--------|---------------------------|--------|
| Água livre de nuclease | 7 µl | Controle negativo: | |
| dNTP (10mM) | 1 µl | Água livre de nuclease | 8 µl |
| MgCl ₂ (2mM) | 2 µl | DNTP (10 mM) | 1 µl |
| Tampão (5x) | 4 µl | MgCl ₂ | 2 µl |
| Transcriptase Reversa | 1 µl | Tampão (5x) | 4 µl |
| Total | 15 µl | Total | 15 µl |

Tabela 08: *Primers* utilizados no RT-PCR.

| Primer | Seqüência 5' - 3' |
|-------------------------------|--|
| <i>Forward</i> E5B1AU1XhoI | 5'ATTCTCGAGGCCACCATGGACACCTATCGCTATATACCRAATCTATGGTTTC 3' |
| <i>Reverse</i> E5B1HisNotI | 5' ATAGCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATGAAAGGGCAGACC 3' |

Para cada amostra, foi adicionado 15µl da reação com e sem transcriptase para incubação a 25°C, por 5 minutos, 42°C, por 1 hora e 70°C, por 15 minutos. No controle negativo do *primer* foi adicionado o mix com transcriptase reversa.

A amplificação foi feita através da RT-PCR (*Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa), utilizando-se 1 µl de cDNA, 13 µl de H₂O, 2,5µL de tampão (10x), 0,5µL de dNTP (2mM), 0,5µL de MgCl₂ (50mM), 0,5µL de Taq DNA Polimerase (5U/µL) e 1,5µl (10pmol/µl) de cada *primer*, para um volume final de 25 µl de reação. Os primers utilizados pareiam nas extremidades do gene E5, resultando em um produto de amplificação de 175 pb (Tabela 08). O programa usado no termociclador foi: Desnaturação inicial a 94°C por 1’; 35 ciclos de 94°C por 20’’, 50°C por 40’’ e 72°C por 30’’; extensão final a 72°C por 2’.

4.7.3 Avaliação da expressão da proteína E5 por SDS-PAGE

As células 293 foram transfectadas com o vetor vazio pCI-neo e com a construção pCIE5sintB1/B2. Após 48 horas da transfecção, as células foram ressuspendidas em 600µl de tampão 2X Laemmli desnaturante (10% SDS, 1M Tris-HCl pH6.8, Glycerol, Água e Azul de Bromofenol) mais inibidor de protease (Roche), em uma proporção de 1:1 (volume referente a placa de cultura de 6 poços). A lise celular foi realizada de forma mecânica, com ajuda da agulha de insulina, e os extratos aquecidos a 95°C durante 5 minutos. As amostras protéicas dos extratos celulares foram guardadas a -20°C para análises subseqüentes.

Os extratos protéicos foram submetidos a uma eletroforese em gel SDS-PAGE (15%) e coradas com *Coomassie blue*.

4.7.4 Avaliação da expressão da proteína E5 através de Dot Blot

As reações de “Dot Blot” foram realizadas com os extratos de células transfectadas com a construção pCIE5sintB1/B2, vetor vazio pCI-neo e apenas o extrato da célula 293, os dois últimos como controle negativo. Cada poço da placa de cultura de 6 poços foi ressuspendido em 50µl de inibidor de protease e 50µl do tampão 2X Laemmli desnaturante (10% SDS, 1M Tris-HCl pH6.8, Glicerol, Água e Azul de Bromofenol). A lise foi feita de forma mecânica com ajuda de uma agulha de insulina e

os extratos aquecidos a 95°C por 5 minutos. As amostras foram liofilizadas, ressuspensas em 120µl de PBS 1X estéril e posteriormente quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976). As concentrações protéicas utilizadas foram de 3 e 6µg, as quais se ligaram à membrana de nitrocelulose por 1 hora, seguido de um processo de lavagem com 1X PBS. Essa membrana foi bloqueada por 1 hora com leite 2,5% e lavada com 1X PBS. O anticorpo primário (conjugado a biotina que reconhece o epítopo AU1, Covance) foi adicionado na diluição 1:1000 e 1:2000 em leite 1% e incubado por 1 hora a 37°C, seguido de outra lavagem com 1X PBS. Em seguida houve a adição da streptavidina diluída 1:2000 em leite 1% para incubação de 1 hora, a 37°C. A lavagem com 1X PBS foi repetida antes da revelação com TMB (tetra metil di-hidrocloreto de benzidina, Sigma, USA), o qual foi dissolvido em metanol a 65°C, por 1 hora e, posteriormente, adicionado tampão citrato pH 4,0 e H₂O₂. A reação foi observada após 15-20 min, no escuro e interrompida por lavagem da membrana com água destilada.

4.7.5 Imunoprecipitação

A expressão de E5 foi analisada pela imunoprecipitação em placa de cultura de 100 mm, com uma confluência de 80%, usando o anticorpo monoclonal AU1. As células 293 transfectadas com a construção pCIE5sintB1/B2 (descrita anteriormente) foram analisadas quanto à expressão de E5. Como controle negativo, as células foram transfectadas com o vetor vazio pCI-neo e também foi utilizado o extrato celular da célula 293. Após 48 horas, as células foram mantidas no gelo, lavadas três vezes com 1X PBS gelado e incubadas por 5 minutos com 1 ml do tampão de radioimunoprecipitação (RIPA) [20mM MOPS (ácido morfolino propanosulfônico) 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 1% Deoxicolato e 0,1% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), pH 7.0] e inibidor de protease (Roche). As células foram transferidas para eppendorf, homogeneizadas em vórtex por 2 minutos e centrifugadas a 8.000 rpm por 5 minutos. Foram Transferidos 500µl do sobrenadante para outro eppendorf e uma primeira etapa de incubação com o anticorpo primário anti-AU1 (Covance) diluído 1:150, por 1 hora, a 4°C foi realizada em rotação constante. Foi adicionado 25µl da suspensão da proteína A-Sefarose CL-4B (Invitrogen) e incubado por mais 1 hora a 4°C em rotação constante. O imunocomplexo foi lavado 4 vezes com 500µl do tampão RIPA gelado, ressuspensado em 40µl 2X tampão de amostra (10% SDS, 1M Tris-HCl

pH6.8, glicerol, água e 2-Mercaptoetanol) e aquecido por 5 minutos a 95°C. As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE 15%.

4.7.6 Avaliação da expressão da proteína E5 através de Western Blot

Após a imunoprecipitação, as amostras foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% (250V e 30mA) e transferidos por 30 minutos (25V e 400mA) para membranas Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) em sistema semi-seco de transferência (Bio-Rad, Hercules, CA). Após o bloqueio das membranas em solução 5% leite em 1X PBS- 0,01%Tween, elas foram incubadas com o anticorpo monoclonal (1:500) específico contra o epitopo AU1 , 1 hora sob agitação, e lavadas 3X (15 minutos cada) em 1X PBS- 0,05%Tween. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário (1:5000) anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Jackson ImmunoResearch®), 1 hora sob agitação, lavadas e reveladas utilizando um kit de ECL (Amersham, England, UK®).

5. RESULTADOS

5.1. CONSTRUÇÃO DO GENE SINTÉTICO E5

Os genes E5 de BPV1 e BPV2 possuem um grau de identidade muito alto (92%) entre si, o que pode ser observado quando se realiza um alinhamento no programa Blast (NCBI). Com relação às seqüências das proteínas E5 de BPV 1 e 2, não houve nenhuma alteração nos 44 aminoácidos, ou seja, a troca de bases na trinca de nucleotídeos não implicou em mudança de aminoácido. Portanto, o gene sintético E5 produzido pela empresa Epoch Biolabs (USA) é correspondente tanto para BPV1 quanto BPV2.

A otimização do gene E5 para aumento da expressão foi feita com base nos códons preferenciais das células de mamíferos. No gene selvagem E5 foram feitas 38 substituições de bases em 32 códons, mas a seqüência de aminoácidos não foi alterada, com exceção da adição de seis aminoácidos referentes ao epítipo AU1 na porção N-terminal, afim de facilitar a detecção imunológica. Disbrow *et al*, (2003) demonstrou que tanto a proteína E5 (cujo gene foi otimizado), quanto a proteína selvagem apresentaram atividades similares, sugerindo que o epítipo AU1 não altera de forma significativa as funções de E5. A seqüência de aminoácidos está representada na figura 14. Os códons otimizados estão indicados acima dos códons nativos. Também foi acrescentado ao gene a seqüência consenso Kozak, importante para a tradução da proteína no sistema eucarioto, e sítios para as enzimas de restrição XhoI e NotI que flaqueiam o gene e permitem a construção do vetor através da estratégia de subclonagem, como representado abaixo na figura 13.

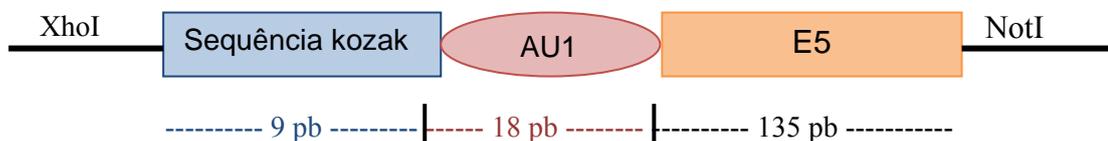


Figura 13. Esquema do gene E5 otimizado (135 pares de bases) e com a presença do epítipo AU1 (18 pares de bases), da seqüência de kozak (9 pares de bases) e dos sítios de clonagem das enzimas XhoI e NotI.

Por se tratar de um aminoácido conservado, a glutamina 17 é o principal responsável pela ação transformante da proteína E5. Sendo assim, o mesmo foi substituído pela glicina, já que é sabido que este último extingue a atividade biológica

da proteína E5 (Sparkowski *et al*, 1994). Como o objetivo do trabalho foi a construção de uma vacina de DNA utilizando o gene E5 de BPV 1 e 2 a ser aplicado na imunização genética, não seria interessante manter a sua ação transformante.



Figura 14. Sequência de DNA do gene E5 BPV1/2 selvagem (em preto) e códons otimizados (em vermelho) indicados acima dos códons nativos. O aminoácido 17 foi alterado de glutamina para glicina (sublinhado). As letras indicam os aminoácidos equivalentes a cada códon.

5.2. SUBCLONAGEM DO GENE E5 EM VETOR DE EXPRESSÃO pCI-neo

O gene Sintético E5 foi devidamente liberado do pBluscript após digestão dupla com as enzimas XhoI e NotI (Promega), e purificado para posterior subclonagem no vetor de expressão pCI-neo, o qual foi devidamente digerido com as mesmas enzimas, como mostra a figura 15.

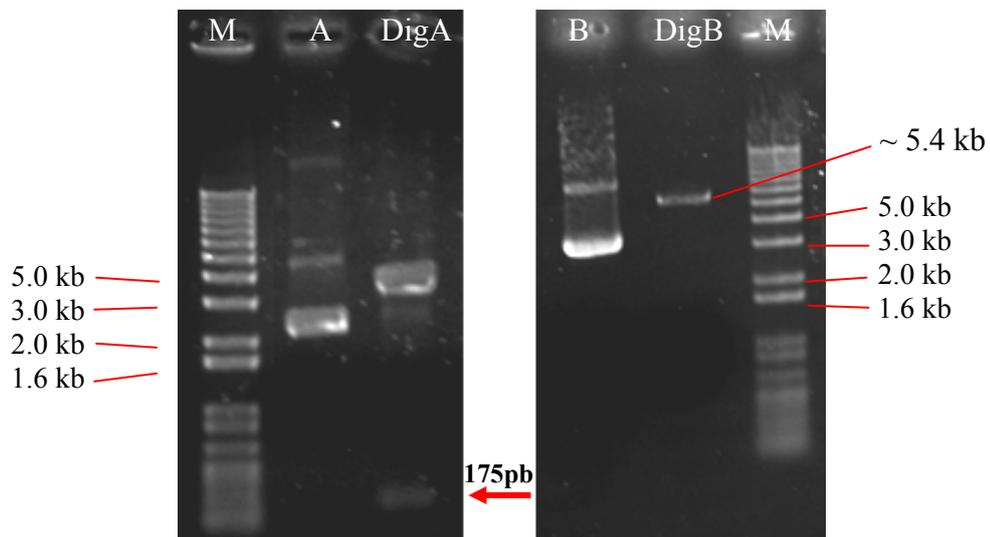


Figura 15. Digestão dupla do plasmídeo pBlueScriptE5sintB1/B2 e linearização do vetor de expressão pCI-neo com as enzimas XhoI e NotI. Liberação do gene sintético E5 (fragmento de 175 pb). M- marcador molecular de 1Kb (Invitrogen), A – extração plasmidial pBlueScriptE5sintB1/B2, Dig A – digestão pBlueScriptE5sintB1/B2, B – extração do vetor pCI-neo, Dig B – digestão pCI-neo. Eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos.

Após a purificação tanto do inserto quanto do vetor pCI-neo foi realizada a ligação para obtenção da construção pCIE5sintB1/B2. Por meio de PCR, utilizando os *primers* de detecção, foi possível rastrear e indicar a provável existência de sete clones nos quais estaria presente o gene E5. Os oligonucleotídeos utilizados (*Forward* pCI-neo / *Reverse* interno E5) amplificaram um fragmento de 190pb, correspondendo a uma porção do vetor pCI-neo e parte do gene E5, como ilustrado nas figuras 16 e 17. Porém, não garantem que o gene está na orientação correta.

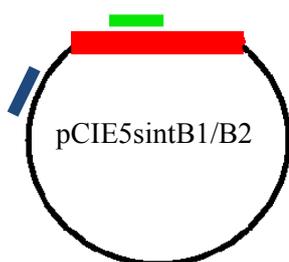


Figura 16. Esquema da PCR para detecção do clone pCIE5sintB1/B2. Pareamento dos *primers Forward* pCI-neo (em azul) e *Reverse* interno E5 (em verde) na construção pCIE5sintB1/B2. O gene E5 representado em vermelho e o vetor pCI-neo em preto. Amplificação de um fragmento de 190pb.

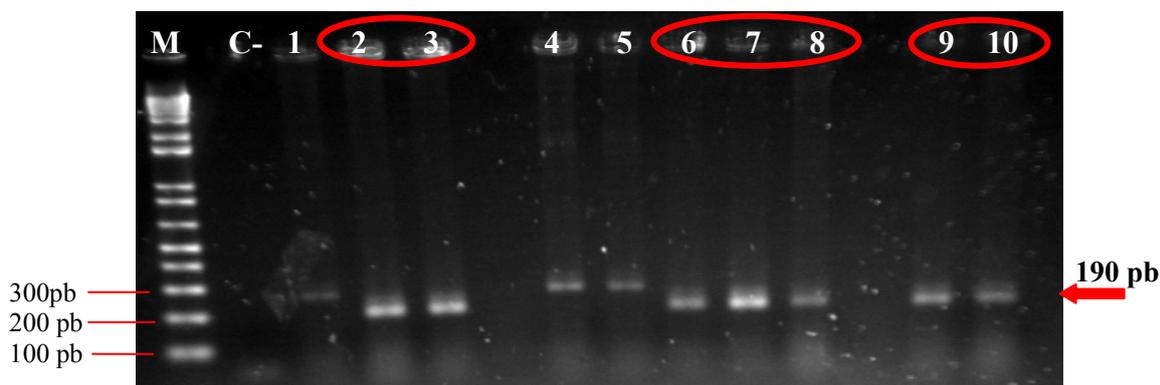


Figura 17. PCR dos possíveis clones contendo a construção pCIE5sintB1/B2; M- marcador molecular de 1Kb (Invitrogen); C- (Controle negativo); 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10 – sete clones que indicam a presença do gene E5; fragmento de 190 pb. Eletroforese em gel de agarose 2% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos.

Desta forma, foi realizada outra PCR para verificar a orientação correta do gene nos sete possíveis clones, utilizando um *primer forward* que pareia na região de ligação entre o inserto e vetor (*Forward* pCI-neo – E5) e um reverso que pareia no pCI (*Reverse* pCI-neo). O produto da amplificação gerou um fragmento de 280 pb, como representado na figura 18. Dos sete possíveis clones foram analisados apenas quatro (2, 3, 6 e 7), uma vez que os sete possíveis clones apresentaram um mesmo padrão de banda; e todos apresentaram a amplificação esperada de 280 pb (Figura 19).

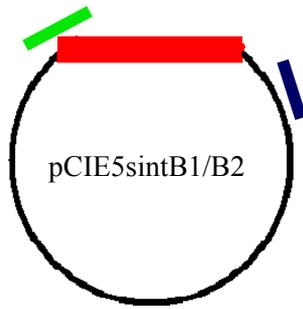


Figura 18. Reação de PCR para confirmação da orientação do gene E5. Anelamento dos *primers Forward* pCI-neo – E5 (em verde) e *Reverse* pCI-neo (em azul) na construção pCIE5sintB1/B2. O gene E5 representado em vermelho e o vetor pCI-neo em preto.

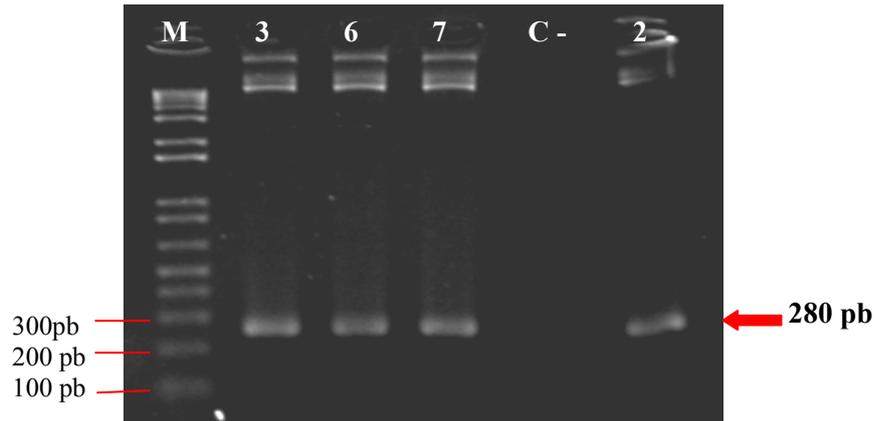


Figura 19. PCR para verificar a orientação correta do gene E5. Os quatro possíveis clones (2, 3, 6 e 7) submetidos à amplificação geraram um fragmento de 280pb, indicando a orientação correta. M- marcador molecular de 1Kb (Invitrogen); C- (Controle negativo). Eletroforese em gel de agarose 2% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos;

A clonagem do gene E5 no vetor de expressão pCI-neo foi comprovada por digestão dupla com as enzimas *XhoI* e *NotI*, liberando um fragmento de 175 pb (figura 20); e por seqüenciamento (*Forward* pCI-neo e *Reverse* pCI-neo), que confirmou a seqüência correta do gene E5 clonado no vetor de expressão em célula de mamífero pCI-neo.

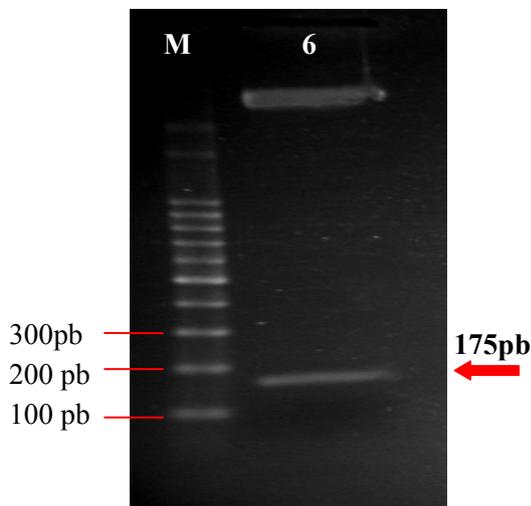


Figura 20. Digestão dupla do clone pCIE5sintB1/B2 com *XhoI/ NotI* (Promega). M- marcador molecular de 100pb (Invitrogen); 6 – digestão dupla do clone, liberando o respectivo fragmento E5B1/B2 (~175pb). Eletroforese em gel de agarose 2% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos.

5.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA E5

5.3.1 Análise de transcrição do gene E5

Com o intuito de avaliar a presença de RNA mensageiro e conseqüentemente confirmar a ocorrência de transcrição do gene E5, o RNA total foi extraído (48 horas após a transfecção) para realização de uma RT-PCR, tanto das células 293 transfectadas com a construção pCIE5sintB1/B2, quanto das células com o vetor vazio pCI-neo, e ainda das células 293 sem vetor, estes dois últimos como controle negativo. Um fragmento de 175 pb referente ao gene E5, amplificado do cDNA obtido com a transcrição reversa, foi observado apenas nas amostras transfectadas com a construção pCIE5sintB1/B2. Os controles negativos não apresentaram nenhuma amplificação (Figura 21).

Para descartar a possibilidade de contaminação das amostras de RNA total com DNA, uma reação de transcrição reversa sem a transcriptase reversa foi realizada para todas as amostras. A PCR realizada com este material foi negativa, indicando que não houve contaminação com DNA e a amplificação do fragmento de 175 pb observada nas amostras com transcriptase reversa é um indicativo que o gene E5 está sendo transcrito, já que apenas as amostras transfectadas com a construção pCIE5sintB1/B2 apresentou este padrão de banda.

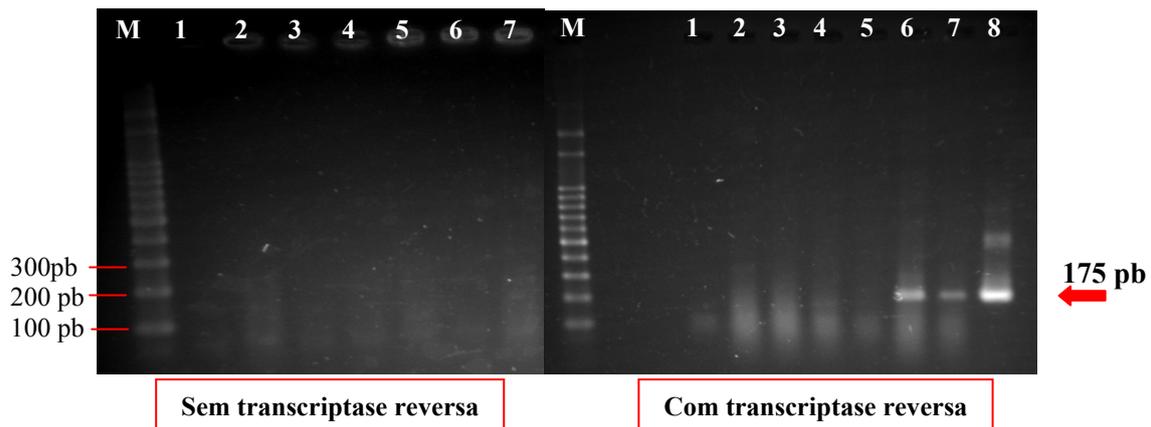


Figura 21. RT-PCR para análise da transcrição de E5. M: Marcador 100 pb (invitrogen); Poço 1: Controle negativo da PCR (sem transcriptase) e Controle negativo da RT-PCR (sem RNA e com transcriptase); poços 2 e 3: apenas células 293 ; poço 4 e 5: células transfectadas com o vetor vazio pCI-neo; poço 6 e 7: Células transfectadas com pCIE5sintB1/B2; poço 8: controle positivo da PCR (sem transcriptase). Eletroforese em gel de agarose 2% em TAE; voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos.

5.3.2 Avaliação da expressão da proteína E5 através de gel SDS-PAGE

As células 293 transfectadas com o vetor vazio pCI-neo e com a construção pCIE5sintB1/B2 foram lisadas após 48 horas de transfecção e foram submetidas a uma eletroforese em gel SDS-PAGE 15% e 20%, para verificação da integridade das proteínas, assim como a presença de E5, proteína de interesse. As células 293, sem transfecção, também foram lisadas e analisadas.

A eletroforese em gel SDS-PAGE 15% foi estabelecida como padrão para análise da expressão da proteína E5 em células de mamíferos, pois apresentou um perfil de separação das proteínas celulares, mais homogênea e menos densa que o observado no gel SDS-PAGE 20%.

A figura 22 mostra que não ocorreu degradação das proteínas durante o processo de lise celular, entretanto não pôde ser visualizada uma banda específica de aproximadamente 10 kDa, correspondente à proteína E5, na amostra pCIE5sintB1/B2. O padrão de bandas não apresentou nenhuma diferença significativa entre as amostras estudadas.

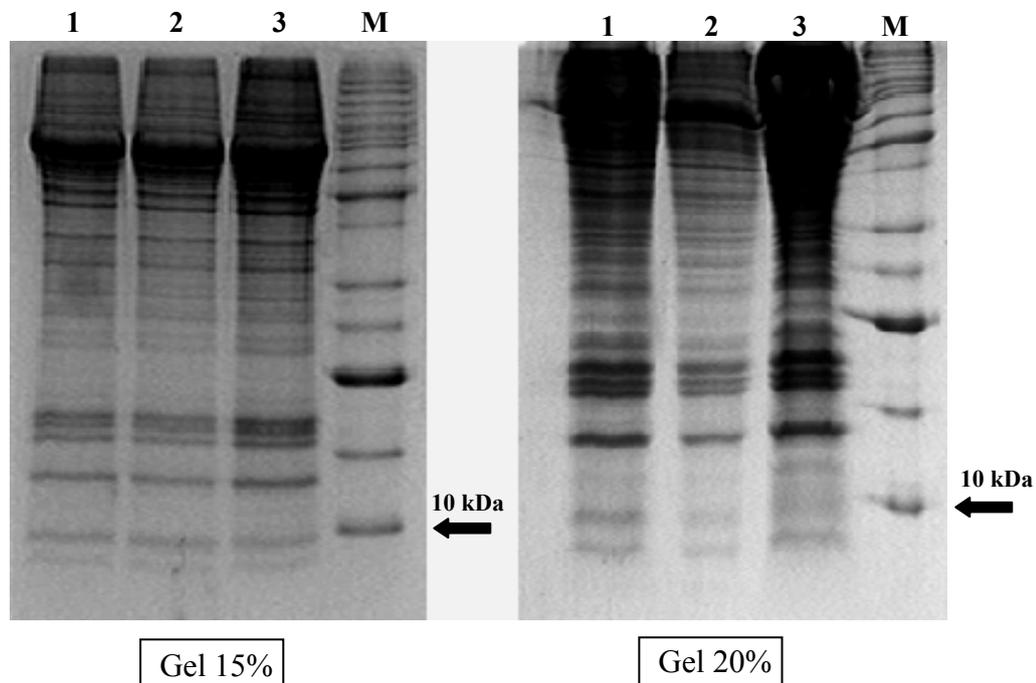


Figura 22. Análise por eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE dos extratos das células 293 sem transfecção e transfectadas com o vetor vazio pCI-neo e com a construção pCIE5sintB1/B2. M: Marcador Bench Marker (Sigma). Poço 1: extrato das células 293; poço 2: vetor vazio pCI-neo e poço 3: pCIE5sintB1/B2. Gel SDS-PAGE (15% e 20%), corado com *Coomassie blue*.

5.3.3 Avaliação da expressão da proteína E5 através de Dot Blot

Para verificar se as células 293 transfectadas com o gene E5 otimizado eram capazes de expressar a proteína E5 de BPV 1 e 2, estas foram transfectadas (mais uma vez) com a construção vacinal pCIE5sintB1/B2 e com o vetor vazio pCI-neo. Após 48 horas, os extratos protéicos foram produzidos, quantificados e utilizados nos ensaios de dot blot. Também foi processado o extrato protéico apenas das células 293, servindo como um segundo controle negativo.

Nos ensaios de dot blot foram utilizados o anticorpo primário anti-AU1 (conjugado a biotina) nas diluições de 1:1000 e 1:2000; e streptavidina na diluição de 1:2000 (figura 23). Foi possível detectar a proteína E5, a qual possui o epítopo AU1 na região N-terminal, apenas nas amostras transfectadas com a construção pCIE5sintB1/B2, utilizando diferentes quantidades do extrato celular, 3 μ g e 6 μ g. A possibilidade de detectar a proteína utilizando uma quantidade mínima do extrato celular, 3 μ g, e a diluição máxima do anticorpo primário, 1:2000, indica que não houve sobrecarga ou ligação inespecífica do anticorpo nas amostras com 6 μ g. No entanto, o melhor resultado foi observado utilizando 6 μ g do extrato celular e com a diluição de 1:1000 do anticorpo primário. A presença da proteína no extrato protéico indica que além de transcrito, o gene E5 foi traduzido.

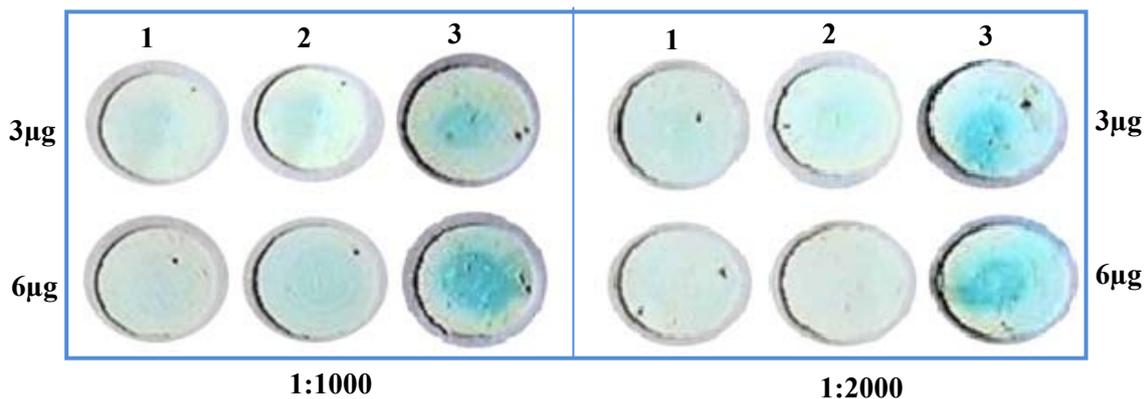


Figura 23. Dot blot para detecção da proteína E5 utilizando o anticorpo anti-AU1 (conjugado a biotina). Lisado das células 293 sem transfecção (1), células transfectadas com o vetor vazio pCI-neo (2) e células com a construção pCIE5sintB1/B2 (3). As amostras foram quantificadas e aplicadas na membrana de nitrocelulose a uma concentração de 3 μ g e 6 μ g. O dot blot foi revelado por TMB.

5.3.4 Avaliação da expressão da proteína E5 através de Western Blot

As amostras foram analisadas quanto à expressão de E5 por Western Blot, 48 horas pós-transfecção. Todas as amostras foram imunoprecipitadas utilizando o anticorpo anti-AU1 (Covance) numa diluição 1:150 e quantificadas pelo método de Bradford. As amostras foram fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidos para membrana de nitrocelulose. Apenas nas células transfectadas com a construção pCIE5sintB1/B2 foi possível detectar a proteína E5 no tamanho esperado, aproximadamente 10 KDa, e a quantidade de extrato celular utilizado, após a imunoprecipitação, foi de 15µg (Figura 24). O peso molecular da proteína E5 foi confirmado, utilizando o marcador MagicMark, o qual apresenta a última banda com peso molecular de 20 KDa, e também através do marcador Prestained, que possui a última banda equivalente a um peso de 10 KDa. Este último marcador pode ser transferido para a membrana de nitrocelulose e comparado com o filme Kodak revelado pelo western blot.

Estes dados sugerem que houve uma eficiente tradução da proteína E5 nas células transfectadas com a construção pCIE5sintB1/B2, a qual não foi saturada pela indisponibilidade dos tRNA requeridos na tradução dos códons raros presentes no gene E5 selvagem. Estes resultados confirmam a expressão do antígeno vacinal em células de mamíferos.

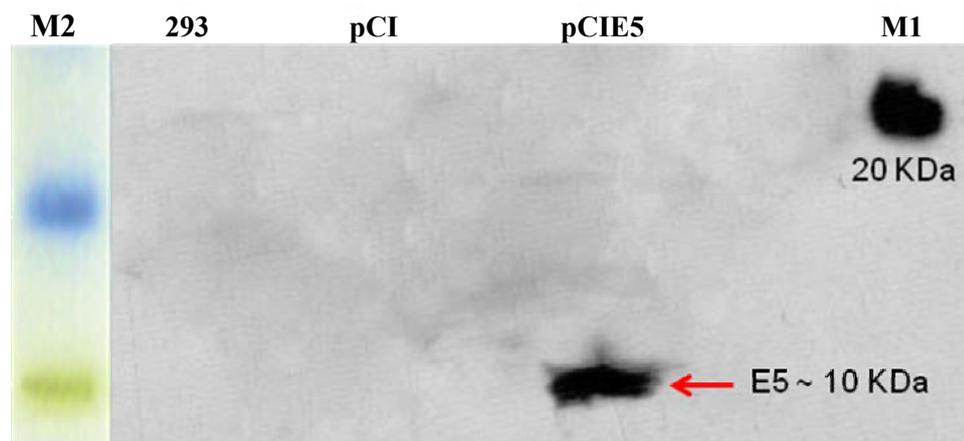


Figura 24. Imunoprecipitação da proteína E5 de BPV-1 e 2 expressa em células de mamíferos. O anticorpo anti-AU1 detectou a proteína E5 apenas nas células transfectadas com a construção pCIE5sintB1/B2. 293: células sem o vetor; pCI: células apenas com o vetor; ambas como controle negativo. M1 : marcador de peso molecular *MagicMark* (Invitrogen®), M2: Marcador de peso molecular *Prestained* (Promega).

6. DISCUSSÃO

Os BPVs 1 e 2 são carcinogênicos e estão relacionados com o câncer da bexiga urinária. Embora os PVs sejam espécie-específicos, existe um único caso de infecção cruzada do BPV 1 e 2 com cavalos e outros eqüídeos, resultando em uma lesão tumoral comum em eqüinos, o sarcóide eqüino, que pode levar ao sacrifício do animal (Campo, 2003). Uma estratégia vacinal dirigida para a prevenção do sarcóide em eqüinos e da papilomatose cutânea e câncer de bexiga em bovinos é muito importante, entretanto, como existem muitos animais já infectados e afetados pela doença, uma proposta terapêutica se torna necessária e muito aguardada pelos criadores. As técnicas de clonagem e expressão gênica são imprescindíveis para o desenvolvimento de uma vacina eficaz, em virtude da impossibilidade de produção em laboratório de uma grande quantidade de vírions para fins vacinais (Da Silva *et al.*, 2001). Isto se deve ao fato de que o processo de formação dos vírions é dependente da diferenciação epitelial (Beddel *et al.*, 1991).

A imunização genética tem sido documentada como uma estratégia efetiva para a indução da imunidade humoral e celular num grande número de modelos animais. Esta estratégia é capaz de proteger o hospedeiro contra novas infecções virais e regressão das lesões papilomatosas já estabelecidas. A vacina de DNA apresenta várias vantagens atraentes como a sua simplicidade na produção, estabilidade de temperatura e segurança biológica (Lin *et al.*, 2006). Com base nisto, este trabalho utilizou o gene E5 de BPV-1 e 2 para a construção da vacina de DNA com a finalidade terapêutica para bovinos.

Estudos da biologia e bioquímica de E5 tornam-se difíceis devido aos baixos níveis de expressão da proteína em sistemas heterólogos, até mesmo quando sistemas de promotores induzíveis foram utilizados (Crusius *et al.*, 1997, 1998). A expressão de antígenos virais em células eucarióticas pode ser uma tarefa bastante árdua, especialmente pelo fato destes organismos utilizarem códons preferenciais divergentes. No entanto, o aumento da expressão de proteínas heterólogas em vários sistemas biológicos é possível devido à alteração dos códons que influenciam na eficiência da tradução. Vários estudos têm demonstrado que a vacina de DNA com genes otimizados é capaz de elicitar uma forte resposta imune humoral e celular quando comparado aos vetores que contêm os genes selvagens (Andre *et al.*, 1998; Zur *et al.*, 2000).

Muitos autores sugerem que a expressão dos genes não otimizados pode ser limitada pela indisponibilidade de tRNA para os códons raros (Kane *et al*, 1995; Slimko & Lester, 2003). Desta forma, a tradução ficará bastante comprometida e poderá resultar em níveis baixos de proteína, sendo difíceis de serem detectados pelas técnicas convencionais. De Pasquale & Kandue (1998) demonstraram que a tradução do gene E7 pode ser aumentado, *in vitro*, pela adição de tRNA exógeno. Além disso, a otimização de códons virais pode facilitar o uso de tRNA das células de mamífero na tradução das proteínas virais (Lin *et al*, 2006), como foi observado na expressão das proteínas L1 e L2 do BPV-1, e também nas proteínas E6 e E7 do HPV-16 (Zho *et al*, 1999; Cid-Arregui *et al*, 2003). Liu e colaboradores (2002) demonstraram que além do acréscimo na expressão da proteína E7 de HPV-16, também houve aumento na imunogenicidade específica da vacina de DNA. Corroborando o resultado anterior, Steinberg *et al* (2005) evidenciaram que a otimização do gene E7 do HPV-16 resultou em um aumento da eficiência de tradução e na resposta dos linfócitos citotóxicos em ratos C57BL/6 vacinados.

Sabe-se que o uso do gene otimizado aumenta a expressão da proteína, e esse acréscimo poderia estar relacionado com o aumento da transcrição ou com a maior estabilidade do mRNA. Collier e colaboradores (1998) demonstraram que alterando a seqüência de L2 do HPV16 houve um aumento da estabilidade do mRNA, contribuindo para um acréscimo da expressão da proteína. Liu *et al* (2002) evidenciaram que a razão dos mRNA presentes nas células Cos-1 transfectadas com o gene E7 selvagem e com o gene E7 otimizado foi de 1:1,3 (E7 selvagem: E7 otimizado), porém, a expressão desta proteína foi dramaticamente maior quando o gene E7 otimizado foi utilizado. Assim, pode-se concluir que o aumento da expressão de E7 pela otimização de códons foi uma consequência do aprimoramento da tradução do mRNA, ao invés do aumento da transcrição deste mRNA ou mesmo da maior estabilidade do mRNA. Corroborando este resultado, Ko *et al* (2005) relataram que o aumento da expressão da proteína Ag85B da *Mycobacterium tuberculosis* ocorreu devido a um aumento da tradução do mRNA correspondente, ao invés da elevação no nível de transcrição deste gene. Portanto, a expressão da proteína E5 observada pode ser atribuída ao uso da otimização de códons. Provavelmente, houve aumento na tradução do mRNA de E5, mas não podemos excluir completamente a contribuição de uma melhor transcrição deste mRNA, assim como sua estabilidade.

Foi demonstrado por Cid-Arregui e colaboradores (2003) que mesmo utilizando um promotor forte com o gene selvagem, foi detectada uma quantidade muito pequena da proteína E7 de HPV-16, no entanto, quando foi utilizado o gene otimizado, o nível de expressão aumentou consideravelmente. Este resultado comprova que apenas a presença do promotor forte, como o CMV, utilizado neste trabalho, poderia não ter sido suficiente para termos a expressão considerável da proteína E5 nas células de mamíferos. Além da otimização dos códons, a inclusão da seqüência de Kozak pode ter sido crucial para o bom desempenho em nível de tradução, já que foi comprovado por Steinberg e colaboradores (2005) que a adição desta seqüência conferiu um aumento de 20% na expressão da proteína E7 de HPV16.

Normalmente, tanto o gene E5 de HPV16 e de BPV são expressos a níveis muito baixos em células de mamíferos devido à grande incidência de códons raros (cerca de 40%). Disbrow *et al.* (2003) comprovaram que o nível da expressão de E5 do HPV 16 pode aumentar mais de seis vezes quando a seqüência é otimizada com base no *códon usage* de célula de mamífero. Os altos níveis de expressão de proteína implicam diretamente em elevada resposta imune humoral ou celular, por isso, torna-se necessária a escolha de estratégias que obtenham estes resultados. A otimização de códons do gene E5 representou uma alternativa eficaz para o desenvolvimento de uma vacina terapêutica, anti-tumoral específica para o BPV. Além da otimização foi preciso interromper a ação transformante de E5 para a imunização genética, substituindo, para isso, a glutamina (aminoácido 17) pela glicina.

Sabe-se que o conteúdo G+C de muitos vírus de DNA dupla-fita é diferente do que está presente nas células que eles infectam. Os vírus podem ter evoluído para tirar proveito da composição de códons para regular a expressão dos seus genes, talvez para evitar a expressão de quantidades letais de proteínas virais dentro das células das quais eles utilizam a maquinaria celular para replicar seu genoma. Os genes precoces do papilomavírus, com exceção de E4, têm os padrões de códons preferenciais semelhantes aos dos genes tardios, o que poderia explicar os baixos níveis de expressão destas proteínas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Zhou *et al.*, 1999). Cid-Arregui *et al.* (2003) relataram que o genoma de HPV apresenta uma preferência de 65% pelas bases adenina (A) e timina (T) na terceira posição de cada códon, contrastando com os 42 % presentes nos códons dos genes humanos, e o número é ainda menor (23%) nos genes altamente expressos. Estes dados são uma boa correlação com o baixo conteúdo guanina (G) +

citocina (C) presentes neste vírus (35 – 43%), bem diferente do conteúdo nos genes humanos (53 – 57%). Para investigar se diferenças no uso de códons virais poderiam estar correlacionado com a baixa expressão de E7 de HPV-16, Cid-Arregui e colaboradores (2003) construíram um gene E7 sintético com 63% de G+C (20% a mais que o gene selvagem) e nenhuma base A ou T na terceira posição dos códons. Como esperado, o gene sintético apresentou um expressão bem mais alta que o gene selvagem. A otimização realizada no gene E5 de BPV 1 e 2, apresentou um conteúdo G+C de 87%, 31% a mais que o gene selvagem. Com base nos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que a expressão detectada pode ter sido influenciada pelo aumento do conteúdo G+C e diminuição de A+T, tornando-se semelhante ao observado nos genes humanos, já que utilizamos uma linhagem celular humana.

Como já descrito, a RT-PCR dos clones com a construção vacinal pCIE5sintB1/B2, confirmou a presença do RNA mensageiro do gene E5. No entanto, é necessário que este RNA seja estável e íntegro para que possa ser traduzido, resultando na produção da proteína viral no sistema eucarioto. É bem provável que o RNA mensageiro detectado estivesse íntegro, já que o fragmento gerado correspondeu exatamente, ao tamanho do controle positivo utilizado (gene E5 do BPV-2). Como controle negativo, tivemos as células 293 sem ter sido transfectadas e também transfectadas com o vetor vazio pCI-neo. Este resultado nos dá um subsídio importante para analisar a presença da proteína E5 no meio intracelular.

Para comprovar que as proteínas estavam íntegras, géis SDS-PAGE 15% e 20% foram corridos com diversas concentrações dos extratos celulares, entretanto, a banda esperada (10-KDa), correspondente a proteína E5, não pôde ser visualizada na amostra de pCIE5sintB1/B2. Um dos motivos para isso seria o fato de estarmos tentando detectar uma pequena proteína de membrana, a qual precisa ser isolada adequadamente através da técnica de imunoprecipitação, para que possa, posteriormente, ser detectada por western blot (Suprynowicz *et al*, 2005). A detecção da proteína também não foi possível devido a quantidade de proteínas constitutivas da célula ser muito maior com relação a produção da proteína E5 nas células transfectadas com a construção pCIE5sintB1/B2. Outro motivo seria o fato que nas células transfectadas com o gene de interesse, não apresentam uma expressão tão eficiente da proteína, capaz de visualizar em gel SDS-PAGE.

Portanto, a proteína E5 foi observada por imunodeteção através das técnicas de Dot Blot e Western Blot, este último após imunoprecipitação de E5 utilizando o anticorpo primário AU1. Para estudar as proteínas de membrana, como E5, é necessário solubilizar as biomembranas em uma solução aquosa, que contenha reduzidas concentrações de detergentes não-iônicos (presente no tampão RIPA), capazes de formar os complexos lipídicos e proteínas de membranas isoladas (Disbrow *et al*, 2003; Suprynowicz *et al*, 2000, 2002 e 2005). Através da imunoprecipitação, é possível desprender a proteína E5 de todas as membranas celulares, para que esta possa ser reconhecida pelo anticorpo específico, e, posteriormente, a proteína A seja capaz de reconhecer a porção Fc das moléculas de IgG de várias espécies. A sedimentação deste complexo, por centrifugação, proporciona a possibilidade de separação das proteínas específicas, resultando em uma maior concentração dos antígenos no extrato. Desta forma, facilita a posterior visualização por western blot.

Outra questão a ser levantada é que a quantidade da proteína E5 expressa pode não ter sido suficiente para ser detectada apenas por western blot, já que se tratava de uma expressão transiente. No entanto, alguns trabalhos demonstraram que mesmo em cultura que expressam o gene E5 otimizado de HPV 16 de maneira permanente, o western blot, sem o auxílio de uma prévia imunoprecipitação, não se mostrou adequado para evidenciar a presença da proteína de interesse (Suprynowicz *et al*, 2005). Isto demonstra que a expressão transiente da proteína E5 não é um obstáculo para detecção, a qual, só foi possível após a imunoprecipitação, tornando-se esta, uma ferramenta necessária para detectar a proteína E5 de BPV 1 e 2 em células de mamífero.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que apenas as células transfectadas com a construção pCIE5sintB1/B2 apresentaram transcrição do gene E5 e conseqüente produção da proteína, confirmando a expressão do vetor vacinal em células de mamífero.

7. CONCLUSÃO

Dados sugerem que a otimização de códons de E5 foi capaz de gerar níveis de expressão consideráveis da proteína nas células de mamíferos. Assim, o potencial da vacina de DNA para o tratamento e prevenção, tanto do câncer de bexiga quanto do sarcóide eqüino, provocados pelos BPV 1 e 2, poderá ser testada e comprovada futuramente quanto aos efeitos antitumorais, terapêuticos e profiláticos nos ensaios *in vivo*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abroi A., Ilves I., Kivi S., Ustav M., 2004. *Analysis of chromatin attachment and partitioning functions of bovine papillomavirus type 1 E2 protein*, J. Virol.(2004) 78: 2100–2113.
- Adduci, A.J., Schlegel, R., 1999. *The transmembrane domain of the E5 oncoprotein contains functionally discrete helical faces*. J. Biol. Chem. 274, 10249–10258
- Aichinger, G., Karlsson, L., Jackson, M.R., Vestberg, M., Vaughan, J.H., Teyton, L., Lechler, R.I., Peterson, P.A., 1997. *Major histocompatibility complex class II-dependent unfolding, transport, and degradation of endogenous proteins*. J. Biol. Chem. 272, 29127–29136.
- Anderson R.A., Scobie L., O’Neil B.W., Grindlay G.J., Campo M.S., 1997. *Viral proteins of bovine papillomavirus type 4 during the development of alimentary canal tumours*, Vet. J. 154:69–78.
- Andre, S., B. Seed, J. Eberle, W. Schraut, A. Bultmann, and J. Haas. 1998. *Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage*. J. Virol. 72:1497–1503.
- Andrew, M. C.; Morrissy, C. J.; Lenghaus, C.; Oke, P. G.; Sproat, K. W.; Hodgson, A. L. M.; Johnson, M. A.; Couper, B. E. H., 2000. *Protection of pigs against classical swine fever with DNA delivered gp55*. Vaccine, Kidlington, v.18, p.1932-1938, 2000.
- Angov, E., Hillier, C. J., Kincaid, R. L., Lyon, J. A., 2008. *Heterologous Protein Expression Is Enhanced by Harmonizing the Codon Usage Frequencies of the Target Gene with those of the Expression Host*. PLoS ONE 3(5): e2189.
- Araibi, E.H., Marchetti, B., Ashrafi, G.H., Campo, M.S., 2004. *Downregulation of MHC class I in bovine papillomas*. J. Gen. Virol. 85, 2809–2814.
- Araibi E.H., Marchetti B., Dornan E.S., Ashrafi G.H., Dobromylskyj M., Ellis S.A. e Campo M.S., 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 G.H., Tsirimonaki E., Marchetti B., O'Brien P.M., Sibbet G.J., Andrew L., Campo M.S., 2002. *Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins*. Oncogene 21(2):248-59.
- Ashrafi, G.H., Haghshenas, M., Marchetti, B., Campo, M.S., 2006. *E5 protein of Human Papillomavirus 16 down-regulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain*. International Journal of Cancer, 119, 2105-2112

- Ashrafi, G.H., Brown, D.R., Fife, K.H., Campo, M.S., 2006. *Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins*. *Virus Research* (120) 208-211.
- Azevedo, V.; Levitus, G.; Miyoshi, A.; Cândido, A. L.; Góes, A. M.; Oliveira, S. C., 1999. *Main features of DNA based immunization vectors*. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research*, Ribeirão Preto, v.32, n.2, p.147-153.
- Bastien N., McBride A.A., 2000. *Interaction of the papillomavirus E2 protein with mitotic chromosomes*. *Virology* 270:124V134.
- Baker, T.S.; Newcomb, W.W.; Olson, N.H., Cowser, L.M.; Olson, C.; Brown, J.C., 1991. *Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction*. *Biophys. J.* 60: 1445-1456.
- Baxter M.K., McPhillips M.G., Ozato K., McBride A.A., 2005. *The mitotic chromosome binding activity of the papillomavirus E2 protein correlates with interaction with the cellular chromosomal protein Brd4*, *J. Virol.* 79:4806V4818.
- Bedell, M.A.; Hudson, J.B.; Golub, T.R.; Turyk, M.E.; Hosken, M.; Wilbanks, G.B.; Laimins, L.A., 1991. *Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation*. *Journal of Virology*. V. 65, n. 5, p. 2254 – 2260.
- Borzacchiello G., Ambrosio V., Roperto S., Poggiali F., Tsimonakis E., Venuti A., Campo M.S. e Roperto F., 2003. *Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows*. *J. Gen. Virol.* 84:2921-6.
- Borzacchiello, G., 2007. *Bovine papillomavirus infection in animals*. *Communication Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Ed. A. Méndez-Vilas.
- Borzacchiello G & Roperto F, 2008. *Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle*. *Vet. Res.* 39: 45.
- Bloom, B. R., 1989. *New approaches to vaccine development*. *Reviews of Infectious Diseases*, Chicago, v.11, p.460-466.
- Buck C.B., Thompson C.D., Pang Y.S., Lowy D.R. e Schiller J.T., 2005. *Maturation of Papillomavirus Capsids*. *J Virol* 79:2839-2846.
- Campo, M.S., Jarrett W.F.H., Barron R., O'Neil B.W. e Smith K.T., 1992. *Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle*. *Can. Res.*, Philadelphia, n.52, n.24, p.6898-6904.
- Campo, M.S., O'Neil B.W., Barron R.J. e Jarrett W.F.H., 1994. *Experimental reproduction of the papilloma-carcinoma complex of the alimentary canal in cattle*. *Carcinogenesis*, Oxford, v.15, n.8, p.1597-1601.

- Campo, M.S., 1997. *Vaccination against papillomavirus in cattle*. Clin. Dermatol. 15: 275-283.
- Campo, M.S., 1997a. *Bovine papillomavirus and cancer*. Vet J 154: 175-/188.
- Campo M.S., 1997b. *Vaccination against papillomavirus in cattle*. Clin Dermatol 15:75-283.
- Campo, M.S., 1998. *Persistent infection by bovine papillomavirus*. In: Ahmed, R., Chen, I.S.Y. Persistent Viral Infections. Wiley, pp. 503-516.
- Campo, M.S., 2002. *Animal models of Papillomavirus Pathogenesis*. Virus Research 89: 249-261.
- Campo, M.S, 2003. *Papillomavírus and disease in humans and animals*. Vet Comp Oncol 1: 3-14.
- Campo, M.S., 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, Chap 23.
- Candido A.L, Resende M. e Bessa L.R.G, 2003. *Resposta sorológica de ovinos inoculados com plasmídeos codificando a glicoproteína D do herpesvírus bovino 1 (BHV-1)*. Arq Bras Med Vet Zootec 55:256-261.
- Carvalho C., Freitas A.C., Brunner O, Góes L.G.B., Yagui-Cavalcante A., Beçak W. and Stocco dos Santos R.C., 2003. *Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine female*. Braz J Microbiol 34: 72-73.
- Chambers G, Ellsmore V.A, O'Brien P.M., Reid S.W., Love S., Campo M.S., Nasir L., 2003. *Sequence variants of bovine papillomavirus E5 detected in equine sarcoids*. Virus Res. 96(1-2):141-5.
- Chandrachud L.M., Grindlay G.J., McGarvie G.M., O'Neil B.W., Wagner E.R., Jarrett W.F., Campo M.S., 1995. *Vaccination of cattle with the N-terminus of L2 is necessary and sufficient for preventing infection by bovine papillomavirus-4*. Virology. 211(1):204-8.
- Cid-Arregui A., Juarez V. and zur Hausen H., 2003. *A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies*. J. Virol. 77: 4928–4937, 2003.
- Collier, B., Goobar-Larsson, L., Sokolowski, M., Schwartz, S., 1998. *Translational inhibition in vitro of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogenous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2*. J. Biol. Chem. 273, 22648–22656.

- Condon C., Watkins S.C., Celluzzi C.M., Thompson K. and Falo L.D. Jr, 1996. *DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells*. Nat. Med. 2: 1122–1128.
- Confer, A.W. & Panciera, R.J., 2001. *The urinary system*. In Thomson's Special Veterinary Pathology, 3^a ed. Pag. 235-77. Editora WW Carlton & JF Zachary. St Louis, Missouri: Mosby.
- Cong, H., Gu, Q. M., Zhou, H. Y., Guo, L., Yang, T. L., He, S. Y., Li, Y., Zhao, Q. L., 2005. *Oral mixed DNA vaccine protects mice from infection of Toxoplasma gondii*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, v.23, n.3, p.159-162.
- Corrêa W.M. e Corrêa C.N.M., 1992. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos: Papilomatoses*. Rio de Janeiro, Medsi, 843p. 2.ed.
- Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T., Dietrich, G., 1999. *The nature of the MHC class I peptide loading complex*. Immunol. Rev. 172, 21–28.
- Crusius, K., Auvinen, E., Alonso, A., 1997. *Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein*. Oncogene 15, 1437–1444.
- Crusius, K., Auvinen, E., Steuer, B., Gaisert, H., Alonso, A., 1998. *The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT*. Exp. Cell Res. 241, 76–83.
- 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.
- Davis, H. L., McCluskie, M. J., 1999. *DNA vaccines for viral diseases*. Microbes Infection, Berlin, v.1, n.1, p.7-21.
- De Pasquale, C., and D. Kandue. 1998. *Modulation of HPV16 E7 translation by tRNAs in eukaryotic cell-free translation systems*. Biochem. Mol. Biol. Int. 45:1005–1009.
- De Villiers E-M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H-U. e zur Hausen H., 2004. *Classification of papillomaviruses*. Virology 324:17-27.
- DiMaio, D., Guralski, D., Schiller, J.T., 1986. *Translation of open reading frame E5 of bovine papillomavirus is required for its transforming activity*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 1797–1801.
- DiMaio D., Lai C., Mattoon D., 2000. *The platelet-derived growth factor receptor as a target of the bovine papillomavirus E5 protein*. Cytokine & Growth Factor Reviews 11 (2000) 283-293.

- DiMaio D, Mattoon D., 2001. *Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins*. *Oncogene* 20(54):7866-73.
- Disbrow, G.L., Sunitha, I., Baker, C.C., Hanover, J., Schlegel, R., 2003. *Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression*. *Virology* 311, 105–114.
- Donnelly, J.J. e Ulmer, J.B., 1999. *DNA vaccines for viral diseases*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32: 215-222.
- 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.
- Drummond-Barbosa, D., Vaillancourt, R.R., Kazlauskas, A., DiMaio, D., 1995. *Ligand-independent activation of the platelet-derived growth factor β receptor: requirements for bovine papillomavirus E5-induced mitogenic signaling*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2570– 2581.
- Dunham S.P., 2002. *The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine*. *Res. Vet. Sci.* 73(1):9-16.
- Faccini A.M., Cairney M., Ashrafi G.H., Finbow M.E., Campo M.S., Pitts J.D., 1996. *The bovine papillomavirus type 4 E8 protein binds to ductin and causes loss of gap junctional intercellular communication in primary fibroblasts*. *J Virol.* 70(12):9041-5.
- Ferreira W. & Souza J., 2002. *Microbiologia*. volume 3. LIDEL, Lisboa.
- Frazer I.H., 1996. *Immunology of papillomavirus infection*. *Curr Opin Immunol* 8:484-491.
- Freitas A.C.; Carvalho C., Brunner O., Birgel Jr. E.H., Libera A.M.D., Benesi F.J., Beçak W. and Stocco dos Santos R.C., 2003. *Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the vírus: a discussion about BPV-1*. *Braz J Microbiol* 34: 76-78.
- Freitas A.C.; Silva M.A.R.; Carvalho C.C.R.; Birgel Jr. E.H.; Santos J.F.; Beçak W.; Stocco dos Santos R.C., 2007. *Papillomavirus DNA detection in non epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus*. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*
- Fyan, F. F.; Webster, R. G.; Fuller, D. H.; Haynes, J. R.; Santoro, J. C.; Robinson, H. L., 1993. *DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene gun inoculations*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.90, n.42, p.11478-11482.

- Genther-Williams, S.M., Disbrow, G.L., Schlegel, R., Lee, D., Threadgill, D.W., Lambert, P.F., 2005. *Requirement of epidermal growth factor receptor for hyperplasia induced by E5, a high-risk human papillomavirus oncogene*. Cancer Res. 65, 6534–6542.
- Gerds V., Jons A. e Makoschey B., 1997. *Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination*. J Gen Virol 78:2139-2146.
- Glenting, J., Wessels, S., 2005. *Ensuring safety of DNA vaccines*. Microbial Cell Factories, Barcelona, v.4, n.26, p.1-5.
- Goldstein D.J., Li W., Wang L-M., Heidarani M.A., Aaronson S.A., Shinn R., Schlegel R., Pierce J.H., 1994. *The bovine papillomavirus type 1 E5 transforming protein specifically binds and activates the β - type receptor for platelet-derived growth factor but not other tyrosine kinase-containing receptors to induce cellular transformation*. J Virol 1994;68:4432-41.
- Groff, D.E., Lancaster, W.D., 1986. *Genetic analysis of the 3'early region transformation and replication functions of bovine papillomavirus type 1*. Virology 150, 221– 230.
- Gromme M., Uytdehaag F.G., Janssen H., Calafat J., van Binnendijk R.S., Kenter M.J., Tulp A., Verwoerd D. and Neefjes J., 1999. *Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 10326-10331.
- Haas, J., E. C. Park, and B. Seed. 1996. *Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein*. Curr. Biol. 6:315–324.
- Han R., Reed C.A., Cladel N.M. e Christensen N.D., 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., Notumoto K., Kanno T., 2008. *Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10*. J Gen Virol 89: 158-163.
- Henke, A., 2002. *DNA immunization – a new chance in vaccine research?* Medical microbiology and immunology, Berlin, v.191, p.187-190.
- Hu J., Han R., Cladel N.M., Pickel M.D. e Christensen N.D., 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.
- Ilves I., Kivi S., Ustav M., 1999. *Long term episomal maintenance of bovine papillomavirus type 1 plasmids is determined by attachment to host chromosomes, which is mediated by the viral E2 protein and its binding sites*, J. Virol. (73):4404–4412.
- Jackson M.E., Campo M.S. e Gaurroger J., 1993. *Cooperation between papillomavirus and chemical cofactors in oncogenesis*. Crit Rev Oncog 4: 277-291.

- Jackson M.E. & Campo M.S., 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.
- Jarrett W.F.H., Campo M.S., O'Neil B.W., 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.
- Jelinek F. & Tachezy R., 2005. *Cutaneous Papillomatosis in Cattle.* J Comp Path 132:70-81.
- Kalinna, B.H., 1997. *DNA vaccines for parasitic infections.* Immunology and Cell Biology, Camberra, v.75, p.370-375.
- Kane, J.F., 1995. *Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in Escherichia coli.* Curr Opin Biotechnol, 6:494-500.
- Kano, F.S.; Vidotto, O.; Vidotto, M.C., 2007. *DNA vaccines: general concerns and its applications in human and veterinary medicine.* Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 28, n. 4, p. 709-726.
- Kanodia S., Fahey L.M. e Kast W.M., 2007. *Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response.* Curr Cancer Drug Targets 7(1):79-89.
- Karlin, S., B. E. Blaisdell, and G. A. Schachtel., 1990. *Contrasts in codon usage of latent versus productive genes of Epstein-Barr virus: data and hypotheses* J. Virol. 64:4264-4273.
- Kim, S., Yang, J., 2006. *Human papillomavirus type 16 E5 protein as a therapeutic target.* Yonsei Medical Journal 47: 1-14.
- Ko, Hyun-Jeong; Ko, Sung-Youl; Kim, Yeon-Jeong; Lee, Eun-Gae; Cho, Sang-Nae; Kang, Chang-Yuil, 2005. *Optimization of Codon Usage Enhances the Immunogenicity of a DNA Vaccine Encoding Mycobacterial Antigen Ag85B.* Infection and Immunity, 73: 5666-5674.
- Kodihalli, S., Kobasa, D.L. and Webster, R.G., 2000. *Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines.* Vaccine, 18, 2592-2599
- Kozak, M. 1987. *An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs.* Nucleic Acids Res. 15:8125-8148.
- Kutzler, M. A. and Weiner, D. B., 2008. *DNA vaccines: ready for prime time?* Nature, 9, 776-788.
- Lai, C.-C., Henningson, C., DiMaio, D., 1998. *Bovine papillomavirus E5 protein induces oligomerization and trans-phosphorylation of the platelet-derived growth factor β receptor.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 15241-15246.

- Leal A.M., Ferraz O.P., Carvalho C., Freitas A.C., Beniston R.G., Beçak W., Campo M.S., Stocco dos Santos R.C., 2003. *Quercetin induces structural chromosome aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4*. Journal of Comparative Oncology.
- Lehman C.W., Botchan M.R., 1998. *Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4338–4343.
- Levy, M. Y.; Barron, L. G.; Meyer, K. B.; Szoka, F. C., 1996. *Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into the blood*. Gene Therapy, Pittsburgh, v.3, p.201-211.
- Li, L.; Fang, W.; Li, J.; Huang, Y.; Yu, L., 2006. *Oral DNA vaccination with the polyprotein gene of infectious bursal disease virus (IBDV) delivered by the attenuated Salmonella elicits protective immune responses in chickens*. Vaccine, Kidlington, v.24, n.33-34, p.5919-5927.
- Liao, J. C. F.; Gregor, P.; Wolchok, J. D.; Orlandi, F.; Craft, D.; Leung, C.; Houghton, A.N.; Bergaman, P. J., 2006. *Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibodies responses in dogs with advanced melanoma*. Cancer Immunity, New York, v.6, n.8, p.2-10.
- Lim, P.S., Jenson, A.B., Cowser, J., Nakai, Y., Lim, L.Y., Jin, X.W., Sunberg, J.P., 1990. *Specific interaction of papillomavirus major capsid protein epitopes by immunocytochemistry and epitope scanning of synthetic peptides*. J. Infect. Dis. 162, 1263–1269.
- Lin, C.T., Tsai, Y.C., He, L., Calizo, R., Chou, H.H., Chang, T.C., Song, Y.K., Hung, C.F., Lai, C.H., 2006. *A DNA vaccine encoding a codon-optimized Human Papillomavirus Type 16 E6 gene enhances CTL response and anti-tumor activity*. Journal of Biomedical Science 13: 481-488.
- Liu W.J., Gao F., Zhao K.N., Zhao W., Fernando G.J., Thomas R. and Frazer I.H., 2002. *Codon modified human papillomavirus type 16 E7 DNA vaccine enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and anti-tumor activity*. Virology 301: 43–52.
- Liu, M. A., 2003. *DNA vaccine: a review*. Journal of Internal Medicine, 253: 402-410.
- Liu, M.; Acres, B.; Balloul, J. M.; Bizouarne, N.; Paul, S.; Slos, F.; Squiban, P., 2004. *Gene-based vaccines and immunotherapeutics*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v.101, n.2, p.14567-14571.
- Lowy, D.R.; Kirnbauer, R.; Schiller, J.T.; *Genital human papillomavirus infection*. Proceedings of the National Academy of Science of United States of America. V. 91, p. 2436 – 2440, 1994.

- Macklin, M. D.; McCabe, D.; McGregor, M. W.; Neumann, V.; Meyer, T.; Callan, R.; Hinshaw, V. S.; Sawain, W. T., 1998. *Immunization of pigs with a particle-mediated DNA vaccine to influenza A virus protects against challenge with homologous virus*. The Journal of Virology, Princeton, v.72, p.1491-1496.
- Marchetti B., Ashrafi G.H., Tsirimonaki E., O'Brien P.M., Campo M.S., 2002. *The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface*. Oncogene 21(51):7808-16.
- Marchetti, B., Ashrafi, G.H., Araibi, E.H., Ellis, S.A., Campo, M.S., 2006. *The E5 protein of BPV-4 interacts with the heavy chain of MHC class I and irreversibly retains the MHC complex in the Golgi apparatus*. Oncogene 25, 2254–2263.
- McConaghy F.F., Davis R.E., Reppas G.P., Rawlinson R. J., McClintock S.A., Hutchins D.R., Hodgson D.R., 1994. *Management of equine sarcoids: 1975-93*. N Z Vet J. 42(5):180-4.
- Melo, C.B. & Leite, R.C., 2003. *Papilomatose Bovina*. Ciênc. Vet. Tróp. 6(1):12.
- Modis, Y.; Trus, B.L.; Harrison, S.C., 2002. *Atomic model of the papillomavirus capsid*. The EMBO Journal 21 (18): 4754-4762.
- Morel, P. A.; Falkner, D.; Plowey, J.; Larregina, A. T.; Falo Jr., L. D., 2004. *DNA immunization: altering the cellular localization of expressed protein and the immunization route allows manipulation of the immune response*. Vaccine, Kidlington, v.22, p.447–456.
- Moura J.W., Stocco dos Santos R.C., Dagli M.L.Z., D'Angelino J.L., Birgel E.H. e Becak W., 1988. *Chromosome aberrations in cattle raised on bracken fern pasture*. Experientia 44: 785-788.
- Munger K. e Howley P.M., 2002. *Human papillomavirus immortalization and transformation functions*. Virus Res 89:213-228.
- Nagata, T.; Aoshi, T.; Uchuima, M.; Suzuki, M.; Koide, Y., 2004. *Cytotoxic T-lymphocyte, and helper T lymphocyte oriented DNA vaccination*. DNA and Cell Biology, Philadelphia, v.23, n.2, p.93-106.
- Nasir L. & Campo M.S., 2008. *Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids*. Vet Dermatol. 19(5):243-54.
- Nasir L. & Reid S.W.J., 1999. *Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours*. Virus Res. 61 (2): 171-175.
- Nicholls P.K. e Stanley M.A., 2000. *The immunology of animal papillomaviruses*. Vet Immunol Immunopathol 73:101-127.
- O'Brien P.M. & Campo M.S., 2002. *Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins*. Virus Research 88(2002):103-117.

- 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.
- Oliveira, S. C.; Harms, J. S.; Rech, E. L.; Rodart, R. S.; Bocca, A. L.; Goes, A. M.; Splitter, G. A., 1998. *The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of an intracellular bacterial infection*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Ribeirão Preto, v.32, p.77-84.
- Ozbun M., 2002. *Infectious human papillomavirus type 31b: purification and infection of an immortalized human keratinocyte cell line*. J Gen Virol 83:2753-2763.
- Peña, L.M.; Iaimins, L.A., 2002. *Regulation of human papillomavirus gene expression in vegetative cell cycle*. In: MCCANCE, D.J. ed. *Perspectives in Medical Virology – Human Papillomaviruses*, Elsevier, cap. 4, p. 31 – 35.
- Pertmer, T. M., M. D. Eisenbraun, D. McCabe, S. K. Prayaga, D. H. Fuller, and J. R. Haynes. 1995. *Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA*. Vaccine 13:1427–1430.
- Petti, L., DiMaio, D., 1992. *Stable association between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and activated platelet-derived growth factor receptor in transformed mouse cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6736–6740.
- Petti, L., Nilson, L.A., DiMaio, D., 1991. *Activation of the platelet-derived growth factor receptor by the bovine papillomavirus E5 transforming protein*. EMBO J. 10, 845–855.
- Porgador A., Irvine K.R., Iwasaki A., Barber B.H., Restifo N.P. and Germain R.N., 1998. *Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization*. J. Exp. Med. 188: 1075–1082.
- Prud'homme, G. J., 2005. *DNA vaccination against tumor*. The Journal of Gene Medicine, 7: 3-17.
- Rai, M., Padh, H., 2001. *Expression system for production of heterologous proteins*. Current Science, vol. 80, n°9, 2001.
- Rainczuk, A.; Smooker, P. M.; Kedzierski, L.; Black, C. G.; Coppel, R. L.; Spithill, T. W., 2003. *The protective efficacy of MSP4/5 against lethal Plasmodium chabaudi adami challenge is dependent on the type of DNA vaccine vector and vaccination protocol*. Vaccine, Kidlington, v.21, p.3030-3042.

- Ramshaw, I. A.; Fordham, S. A.; Bernard, C. A.; Maguire, D.; Cowden, W.B.; Willenborg, D. O., 1997. *DNA vaccine for the treatment of autoimmune disease*. Immunology and Cell Biology, London, v.75, p.409-413.
- Ren, S.; Li, M.; Smith, J. M.; Detolla, L. J.; Furth, P.A., 2002. *Low-volume jet injection for intradermal immunization in rabbits*. BMC Biotechnology, Maryland, v.2, n.10, p.1- 6.
- Robinson, H. L., 1997. *Nucleic acid vaccines: an overview*. Vaccine, Kidlington, v.15, n.8, p.785-787.
- Rodrigues Júnior, J. M.; Lima, K. M.; Castelo, A. A. M.; Martins, L. D. B.; Santos, S. A. S.; Faccioli, L. H.; Silva, C. L., 2004. *É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose?* Jornal Brasileiro de Pneumologia, Ribeirão Preto, v.30, p.468-477.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". *Second Edition, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1989.
- Schapiro F., Sparkowski J., Adduci A., Supryniewicz F., Schlegel R., Grinstein S., 2000. *Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein*. J Cell Biol. 148(2):305-15.
- Schiller, J.T., Vass, W.C., Vousden, K.H., Lowy, D.R., 1986. *The E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene*. J. Virol. 57, 1- 6.
- Schiller J. e Lowy D.R., 2001. *Papillomavirus-like particle based vaccines: cervical cancer and beyond*. Expert Opin Biol Ther 1:571-581.
- Schrijver R.S., Hensen E.J., Langedijk J.P., Daus F., Middel W.G., Kramps J.A., van Oirschot J.T., 1997. *Antibody responses against epitopes on the F protein of bovine respiratory syncytial virus differ in infected or vaccinated cattle*. Arch Virol. 142(11):2195-210.
- Schrijver R.S., Langedijk J.P., Keil G.M., Middel W.G., Maris-Veldhuis M., Van Oirschot J.T., Rijsewijk F.A., 1997. *Immunization of cattle with a BHV1 vector vaccine or a DNA vaccine both coding for the G protein of BRSV*. Vaccine 15(17-18):1908-16.
- Seo, S.H., Wang, L., Smith, R. and Collisson, E.W., 1997. *The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of IB virus nucleocapsid induces CTLs and protects chickens from acute infection*. Journal of Virology, 71, 7889-7894
- Shedlock, D.J. e Weiner, D.B., 2000. *DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity*. J. Leukocyte Biology, v.68, p.793-806.
- Siegrist, C. A., 1997. *Potencial advantages and risks of nucleic acid vaccines for infant immunization*. Vaccine, Kidlington, v.15, n.8, p.798-800.

- Slimko, E. M., Lester, H. A., 2003. *Codon optimization of Caenorhabditis elegans GluCl ion channel genes for mammalian cells dramatically improves expression levels*. Journal Neuroscience Methods, p. 1-7.
- Snadeep, K.; Tripathy, S. K.; Svensson, E. C.; Black, H. B.; Goldwasser, E.; Margalith, M.; Hobart, P. M.; Leiden, J. M., 1996. *Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector*. Genetics, Pittsburgh, v.93, p.10876-10880.
- Sparkowski, J., Anders, J., Schlegel, R., 1994. *Mutation of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein at amino acid 17 generates both high and low-transforming variants*. J. Virol. 68, 6120–6123.
- Sparkowski, J., Mense, M., Anders, J., Schlegel, R., 1996. *E5 oncoprotein transmembrane mutants dissociate fibroblast transforming activity from 16-kilodalton protein binding and platelet-derived growth factor receptor binding and phosphorylation*. J. Virol. 70, 2420– 2430.
- Skiadopoulos M.H., McBride A.A., 1998. *Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin*, J. Virol. 72:2079–2088.
- Stanley M.A., 2001. *Human papillomavirus and cervical carcinogenesis*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 15(5): 663-76.
- Steinberg T., Ohlschlager P., Sehr P., Osen W. and Gissmann L., 2005. *Modification of HPV 16 E7 genes: correlation between the level of protein expression and CTL response after immunization of C57BL/6 mice*. Vaccine 23: 1149–1157.
- Stocco dos Santos RC, Lindesay CJ, Ferraz OP. et al. 1998. *Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model*. J. Ger. Virology 79: 1-9.
- Straight, S.W., Hinkle, P.M., Jewers, R.J., McCance, D.J., 1993. *The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and effects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes*. J. Virol. 67, 4521–4532.
- Straight, S.W.; Herman, B.; McCance, 1995. *The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes*. J. Virol. 69:3185-92.
- Sundaram P., Tigelaar R.E. e Brandsma J.L., 1997. *Intracutaneous vaccination of rabbits with the cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) L1 gene protects against virus challenge*. Vaccine 15:664-671.
- Supryniewicz, F.A., Sparkowski, J., Baega, A., Schlegel, R., 2000. *E5 oncoprotein mutants activate phosphoinositide 3-kinase independently of platelet-derived growth factor receptor activation*. J. Biol. Chem. 275, 5111 – 5119.

- Supryniewicz, F.A., Baege, A., Sunitha, I., Schlegel, R., 2002. *c-Src activation by the E5 oncoprotein enables transformation independently of PDGF receptor activation*. *Oncogene* 21, 1695–1706.
- Supryniewicz, F.A., Disbrow, G.L., Simic, V., Schlegel, R., 2005. *Are transforming properties of the bovine papillomavirus E5 protein shared by E5 from high-risk human papillomavirus type 16?* *Virology* 332, 102–113.
- 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.
- Talbert-Slagle, K.; and DiMaio, D., 2008. *The bovine papillomavirus E5 protein and the PDGF β receptor: it takes two to tango*. *Virology*.
- Thomsen, P., van Deurs, B., Norrild, B., Kayser, L., 2000. *The HPV16 E5 oncogene inhibits endocytic trafficking*. *Oncogene* 19, 6023–6032.
- Tindle, R.W., 1996. *Human papillomavirus vaccines for cervical cancer*. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 643-650.
- Tindle R., 2002. *Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer*. *Nature Reviews Cancer* 2: 59-65.
- Tomita Y., Literak I., Ogawa T., Jin Z. and 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.
- Tong X., Salgia R., Li J.L., Griffin J.D., Howley P.M., 1997. *The bovine papillomavirus E6 protein binds to the LD motif repeats of paxillin and blocks its interaction with vinculin and the focal adhesion kinase*, *J. Biol. Chem.* 272:33373–33376.
- Tong X., Boll W., Kirchhausen T., Howley P.M., 1998. *Interaction of the bovine papillomavirus E6 protein with the clathrin adaptor complex AP-1*, *J. Virol.* 72:476–482.
- Uchijima, M.; Yoshida, A.; Nagata, T.; Koide, Y., 1998. *Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restrict T cell responses against an intracellular bacterium*. *Journal Immunology*, Bethesda, v.161, p.5594-5599.
- Ulmer, J. B.; Deck, R. R.; Dewitt, C. M.; Fu, T. M.; Donnelly, J. J.; Caulfield, M. J.; Liu, M. A., 1997. *Expression of a viral protein by muscle cells in vivo induces protective cell-mediated immunity*. *Vaccine*, Kidlington, v.15, n.8, p.839-841.

- Ulmer, J. B.; Donnelly, J. J.; Parker, S. E.; Podes, G. H.; Felgner, P. L.; Dwarki, V. J.; Gromkowski, S. H.; Randall Deck, R.; Dewitt, C. M.; Friedman, A.; Hawe, L.A.; Leander, K. R.; Martinez, D.; Perry, H. C.; Shiver, J. W.; Montgomery, D. L.; Liu, M. A., 1993. *Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein*. Science, New York, v.259, p.1745-1749.
- Vanrompay, D.; Cox, E.; Vandenbussche, F.; Volckaert, G.; Goddeeris, B., 1999. *Protection of turkeys against Clamidia psitaci challenge by gene gun-based DNA immunizations*. Vaccine, Kidlington, v.17, p.2628-2635.
- Xu L. et al., 2006. *Regulation of Smad activities*. Biochim Biophys Acta 1759:503–513.
- Waine, G. J., McManus, D. P., 1995. Nucleic Acids: *Vaccines of the future*. Parasitology Today, Califórnia, v.11, n.3, p.113-116.
- Wang, R.; Doolan, D. L.; Le, T. P.; Hedstrom, R. C.; Coonan, K. M.; Charoenvit, Y., 1998. *Induction of antigen specific cytotoxic T lymphocytes in humans by malaria DNA vaccine*. Science, New York, v.282, p.476-480.
- Wang, S.; Farfan-Arribas, D. J.; Shen, S.; Chou, T.H.W.; Hirsch, A.; He, F.; Lu, S., 2005. *Relative contributions of codon usage, promotor efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine*. Vaccine, Kidlington, v.24, n.21, p.4531- 4540.
- Whalen, R. G. *DNA vaccines for emerging infectious diseases: what if?* Emerging Infectious Diseases, Atlanta, v.2, n.3, p.168-175, 1996.
- William, JB; Kiruaharan, JJ; Uthuman, KM. et al., 1992. *Survey on incidence and complications of bovine cutaneous papillomatosis*. Indian Veterinary Journal 69:842-844.
- Wolff, J. A.; Malone, R. W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgher, P. L., 1990. *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. Science, New York, v.247, p.1465-1468.
- Yang L., Li R., Mohr I.J., Clark R. e Botchan M.R., 1991. *Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2*. Nature 353(6345): 628-32.
- You J., Croyle J.L., Nishimura A., Ozato K., Howley P.M., 2004. *Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes*, Cell 117:349–360.
- Yoshida, A.; Nagata, T.; Uchijima, M.; Higashi, T.; Koide, Y., 2000. *Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses*. Vaccine, Kidlington, v.18, p.1725–1729.
- Zeng L., Zhou M.M., 2002. *Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain*, FEBS Lett 513:124–128.

- Zhang, X.; Divangahi, M.; Ngai, P.; Santosuosso, M.; Millar, J.; Zganiaz, A.; Wang, J.; Bramson, J.; Xing, Z., 2007. *Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: Enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene*. Vaccine, Kidlington, v.25, n.7, p.1342-1352.
- Zheng Z.; Baker C.C., 2006. *Papillomavirus Genome Structure, Expression, And Post-Transcriptional Regulation*. Front Biosci.11:2286-2302.
- Zhou J., Sun X.Y., Stenzel D.J. and Frazer I.H., 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.
- Zhou J., Liu W.J., Peng S.W., Sun X.Y. and Frazer I., 1999. *Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability*. J. Virol. 73: 4972–4982.
- Zimmermann H, Koh C.H., Degenkolbe R, O'Connor M.J., Muller A., Steger G., Chen J.J., Lui Y., Androphy E. e Bernard H.U., 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, M. J., M. C. Chen, B. Doe, M. Schaefer, C. E. Greer, M. Selby, G. R. Otten, and S. W. Barnett. 2000. *Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene*. J. Virol. 74:2628–2635.
- Zur Hausen, H., 2002. *Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application*. Nat Rev Cancer 2:342-350

ANEXO

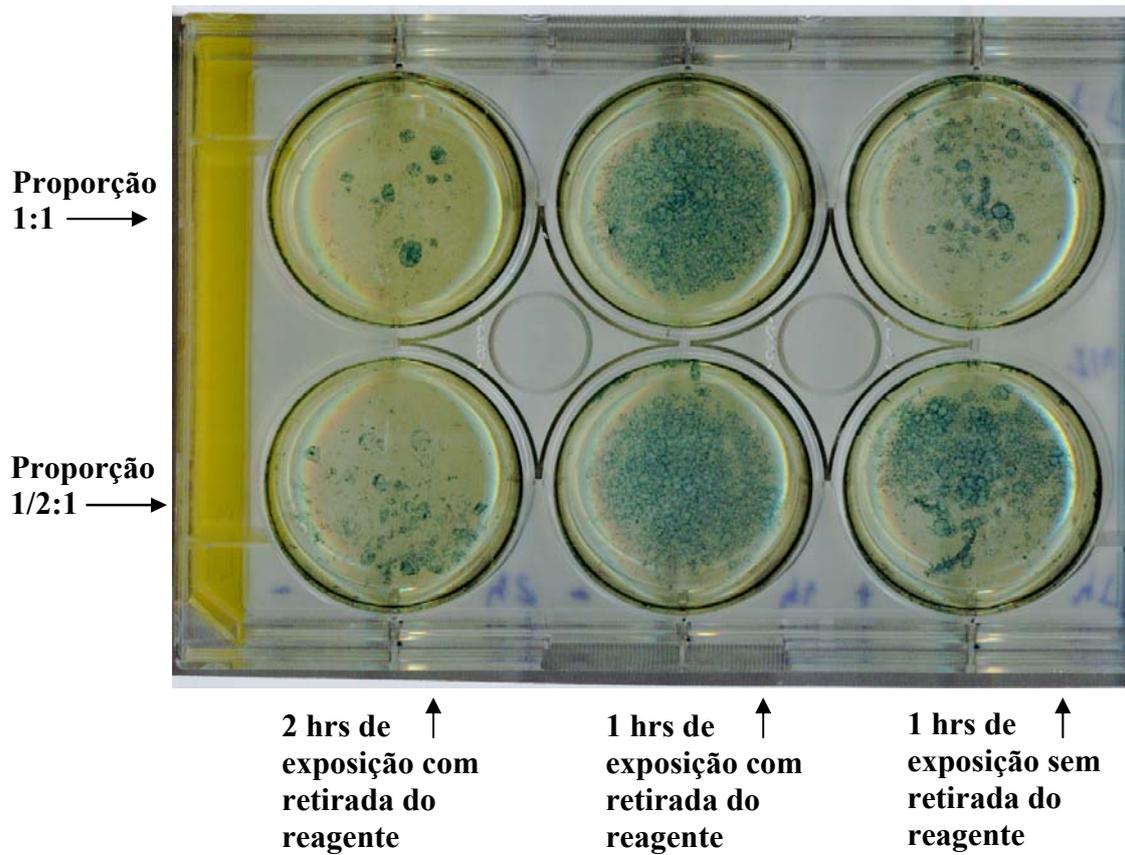
9. Avaliação da eficiência de expressão utilizando o gene repórter β -Galactosidase:

As células transfectadas com o plasmídeo contendo o gene repórter da β -Galactosidase foram incubadas (48 horas /37°C /5% de CO₂) e processadas para a avaliação da eficiência de transfecção, pela atividade de expressão do gene repórter. Após 48 horas da transfecção, as células 293 foram submetidas a reação de coloração do β -gal. Inicialmente, as células foram lavadas duas vezes com 2 ml em 1X PBS (Phosphate-buffered saline, Dulbecco) e fixadas em 1ml de solução 0.2% glutaraldeído por 5 min. Nova lavagem com 1X PBS foi realizada, e em seguida, as células fixadas foram incubadas em um volume final de 1ml de uma solução contendo: 20mg de X-Gal; 0.005M de ferricamida de potássio; 0.005M de ferrocianida de potássio; 0.002M de MgCl₂ em 1X PBS, para o desenvolvimento de coloração pela atividade de β -gal. A incubação foi de 2 horas a 37°C/5% de CO₂.

Alguns testes foram feitos para testar a eficiência e toxicidade do reagente de transfecção (TransFast™ Transfection Reagent - Promega). Inicialmente, foram divididos dois grupos de acordo com a proporção do reagente de transfecção e DNA. Na primeira situação, tivemos a adição de metade do reagente recomendado pelo fabricante, não alterando a quantidade de DNA recomendada (½:1), e na outra situação, foi adicionada a quantidade total indicada pelo fabricante (1:1). Além desta variável, submetemos os dois grupos a três situações: expor as células por 1 hora com o reagente de transfecção e após esse período adicionar mais 1 ml de meio DMEM completo, ou seja, sem retirar o reagente; expor as células por 1 hora, mas retirando o reagente e adicionando 2 ml de meio DMEM completo, e expor as células por 2 horas, também com a retirada do reagente.

De acordo com os resultados obtidos, observamos que 1 hora de exposição das células e sem a retirada do reagente de transfecção (na proporção 1:1), tivemos um grande número de células mortas, indicando a toxicidade do reagente para célula. Porém, quando diminuimos a quantidade do reagente de transfecção (na proporção ½:1) e também sem retirar esse reagente, tivemos uma diminuição significativa da morte celular e uma eficiência de transfecção em torno de 50%. Contudo, quando as células foram expostas por 1 hora com retirada do reagente de transfecção (nas duas proporções), tivemos a maior sobrevivência celular e eficiência de transfecção, em torno de 80%. No entanto, quando aumentamos a exposição das células para 2 horas, mesmo

retirando o reagente de transfecção (nas duas proporções), tivemos morte celular e conseqüentemente baixa eficiência de transfecção. Podemos concluir que para melhorar a eficiência de transfecção, é preciso expor as células por 1 hora com retirada do reagente de transfecção e utilizar a proporção $\frac{1}{2}$ reagente:1 DNA, já que os resultados com a proporção 1:1 foram equivalentes. Vale ressaltar que esses dados são diferentes dos recomendados pelo fabricante, o qual sugere expor a célula por 1 hora sem a retirada do reagente de transfecção, na proporção 1:1 ou 2:1.



10. MEMORIAL DO ALUNO

Nome: Rafaelle Cavalcante de Lira

Data de nascimento: 10/11/1983

e-mail: rafaellelira@gmail.com

orkut: rafaellelira@hotmail.com

Curso de Graduação: Bacharel em Ciências Biológicas

Colação de Grau: Julho de 2006

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo):

- 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia
Lira, R.C.; Jesus, A.L.S.; Coimbra, E.C.; Freitas, A.C.
DESENVOLVIMENTO DE UMA CONSTRUÇÃO VACINAL BASEADA NO GENE E5 DE BPV USANDO “CODON USAGE” A SER APLICADA EM IMUNIZAÇÃO GENÉTICA.
- 54º Congresso Brasileiro de Genética
Lira, R. C.; Silva, M. A. R.; Chagas, B. S.; Pontes, N. E.; Stocco, R. C.; Beçak, W.; Santos, J. F.; Freitas, A. C.
IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO PAPILOMAVIRUS BOVINO EM SÊMEN COMERCIAL CONGELADO DE TOUROS (*Bos taurus*).