

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

André Luiz Santos de Jesus

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS VACINAIS
CONTRA DOENÇAS ASSOCIADAS AO PAPILOMAVÍRUS
BOVINO**

Recife

2013

André Luiz Santos de Jesus

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS VACINAIS
CONTRA DOENÇAS ASSOCIADAS AO PAPILOMAVÍRUS
BOVINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Recife

2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Jesus, André Luiz Santos de

Desenvolvimento de estratégias vacinais contra doenças associadas ao papilomavírus bovino/ André Luiz Santos de Jesus– Recife: O Autor, 2013.

104 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco,
Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2013.**

Inclui bibliografia

- 1. Papilomavírus- vacina 2. Leveduras 3. Imunização I. Freitas,
Antonio Carlos de (orientador) II. Título**

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 202

André Luiz Santos de Jesus

**DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS VACINAIS CONTRA
DOENÇAS ASSOCIADAS AO PAPILOMAVÍRUS BOVINO**

Aprovado em 03/05/2013

Banca Examinadora:

**Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Roberto Soares de Castro
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Dra. Carolina Elsztein
Universidade Federal de Pernambuco**

Recife

2013

**Dedico este trabalho ao meu pai Luiz e minha
mãe Joselinda. Obrigado por tudo!**

Agradecimentos

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

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

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

A CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos citados ou não, meus mais sinceros e profundos votos de gratidão. Obrigado!

Resumo

Os papilomavírus são conhecidos por causarem lesões em tecidos epiteliais em uma variedade de animais. Em bovinos, as doenças associadas ao papilomavírus bovino (BPV) geram perdas econômicas para os criadores. Até agora não existem vacinas ou tratamentos eficazes contra BPV. Esse trabalho teve como objetivo desenvolver estratégias vacinais contra doenças associadas ao BPV. Para a produção de vacinas de subunidade, a levedura *Pichia pastoris* tem sido utilizada com sucesso para a produção de várias proteínas recombinantes. Os genes L1 de BPV1, 2 e 4 foram clonados em vetor de expressão, sob regulação do promotor induzível por metanol *AOX1*. Os recombinantes produziram proteína viral, mas em níveis baixos. Para aumentar a produção, foi utilizada a estratégia de otimização dos códons aliada ao uso de bioreator. Além disso, o gene L1 de BPV1 foi clonado em vetor não comercial, sob controle do promotor constitutivo *PGK1*. A proteína L1 foi detectada por imunoblot no sobrenadante da cultura dos recombinantes. Como abordagem terapêutica, a imunização genética tem sido empregada com alguns produtos disponíveis no mercado. Os genes L2 e E5 de BPV1 foram clonados em vetor de expressão pCI-neo e as construções foram utilizadas para transfectar células HEK293. A expressão gênica foi detectada por RT-PCR e a produção das proteínas virais foi confirmada por Western blot. O presente estudo apresenta resultados promissores para o desenvolvimento de uma plataforma vacinal contra infecções pelo BPV.

Palavras-chave: Papilomavírus bovino; *Pichia pastoris*; imunização genética.

Abstract

Papillomaviruses are known to cause lesions to the epithelial tissues in a variety of animals. In cattle, bovine papillomavirus (BPV) generate major economic losses in livestock. Currently, there are no standard diagnostic tests or prophylactic vaccines against BPV. This study aimed to develop vaccine strategies against diseases associated with BPV. For the production of subunit vaccines, the yeast *Pichia pastoris* has been used successfully for the production of various recombinant proteins. The L1 gene of BPV1, 2 and 4 were cloned into expression vector, under the control of the methanol-inducible *AOX1* promoter. The yeast clones produced viral proteins, but at low levels. To increase heterologous L1 protein levels, a codon optimization strategy was used for production under bioreactor conditions. Moreover, BPV1 L1 gene was cloned into noncommercial vector under control of constitutive *PGK1* promoter. The L1 protein was detected by immunoblot in the culture supernatant of recombinants. As a therapeutic approach, genetic immunization has been used with some products available on the market. BPV1 L2 and E5 genes were cloned into the expression vector pCI-neo and the constructs were used to transfect HEK293 cells. Gene expression was detected by RT-PCR and production of viral proteins was confirmed by Western blot. The present study shows promising results for the development of a vaccine against infections platform BPV.

Key words: Bovine papillomavirus; *Pichia pastoris*; Genetic immunization.

Lista de Ilustrações

Revisão da Literatura

Figura 1. Árvore Filogenética dos papilomavírus	5
Figura 2. Representação linear do genoma de BPV-1	6
Figura 3. Modelo de eventos celulares durante a transformação celular mediada por BPV-1 E5	13
Figura 4. Expressão gênica do PV na infecção produtiva	16
Figura 5. Estrutura de VLPs para uma variedade de vírus	28
Figura 6. Representação da ação das vacinas de DNA	30
Figura 7. Metabolização do metanol em <i>P. pastoris</i>	34
Figura 8. Ilustração das vias glicolítica e gliconeogênica	37

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
AOX1	álcool oxidase
BHV-1	<i>Bovine herpesvirus type 1</i> ou Herpesvírus bovino tipo 1
BPV	<i>Bovine papillomavirus</i> ou papilomavírus bovino
BRSV	<i>Bovine Respiratory Syncicial Virus</i> ou Vírus Sincicial Respiratório Bovino
BVDV	Vírus da Diarreia Bovina
ChPV-1	<i>Capra hircus Papillomavirus type 1</i>
COPV	<i>Canine Oral Papillomavirus</i>
CRPV	<i>Cottontail rabbit Papillomavirus</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FLD1	Formaldeído Desidrogenase
GAP	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GRAS	<i>Generally Regarded As Safe</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HPV	<i>Human papillomavirus</i> ou papilomavírus humano
HSPGs	<i>Heparan Sulfate Proteoglicans</i> ou Proteoglicanos heparan sulfato
kb	Kilobase
kDa	Kilodáton
LCR	<i>Long Control Region</i> ou região longa de controle
MHC-I	<i>Major Histocompatibility Complex class I</i> ou Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe I
nm	Nanômetro
ORF	<i>Open Reading Frame</i> ou Quadro aberto de leitura

OvPV	<i>Ovine Papillomavirus</i> ou Papilomavírus ovino
PDGF-R	<i>Platelet-derived Growth Factor-β Receptor</i> ou Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas
PEX8	proteína da matriz peroxisomal
PGK	3-fosfoglicerato quinase
PV	Papilomavírus
RNA	Ácido Ribonucléico
SV40	<i>Simian Virus 40</i> ou vírus símio 40
VLPs	<i>virus-like particles</i> ou partículas semelhantes ao vírus

Sumário

Resumo	Vi
Abstract	Vii
Lista de ilustrações	Viii
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 Papilomavírus	3
2.2 Genoma do Papilomavírus Bovino	5
2.3 Relação Vírus-Hospedeiro	14
2.4 Papilomatose Bovina	17
2.5 Papilomavírus Bovino e Câncer	19
2.6 Sarcóide Equino	21
2.7 Resposta Imune ao Papilomavírus	23
2.8 Estratégias de Imunização	26
2.9 Sistemas de Expressão Heteróloga	32
2.10 Levedura <i>Pichia pastoris</i>	33
3. Objetivos	40
3.1 Objetivo Geral	40
3.2 Objetivos Específicos	40
4. Capítulo I	41

5. Capítulo II	52
6. Capítulo III	65
7. Discussão Geral	72
8. Conclusões Gerais	78
9. Referências Bibliográficas	79
10. Anexos	90
11. Currículo Lattes atualizado (correspondente ao período do curso)	98

1. Introdução

Infecções por papilomavírus têm sido amplamente caracterizadas e descritas nos últimos anos. Esta família de vírus constitui um grupo de pequenos vírus de DNA caracterizados por induzir a formação de verrugas ou papilomas numa grande variedade de organismos, incluindo o homem. Estas lesões são em geral benignas, podendo regredir naturalmente ou se transformar em tumores malignos.

O papilomavírus bovino (BPV) tem sido amplamente caracterizado tanto por ser considerado um modelo experimental ideal para o estudo do papilomavírus humano (HPV), quanto por sua grande importância na bovinocultura.

A papilomatose bovina, também conhecida como verruga, figueira, verrucose, fibropapilomatose e epiteloma contagioso, é causada pelos BPVs e é caracterizada pela presença de lesões tumorais que ocorrem na pele, mucosas e em alguns órgãos. É uma doença importante economicamente por causar desvalorização dos animais a serem comercializados, causando depreciação do couro dos animais afetados além de alterações funcionais orgânicas. Alguns tipos de BPV têm propriedades oncogênicas, como é o caso dos BPVs 1 e 2 que estão relacionados com o câncer de bexiga urinária e o BPV-4 com câncer do trato digestório superior. Além disso, os BPVs 1 e 2 são encontrados em tumores fibroblásticos de equinos denominados tumores sarcóides.

Mesmo tendo reconhecido impacto econômico para a criação de bovinos e equinos, ainda não há no mercado vacinas ou tratamentos eficazes contra as doenças associadas ao BPV. As principais estratégias para desenvolver vacinas

dirigidas para papilomavírus estão relacionadas com as proteínas L1 e L2, que compõem o capsídeo viral. A indução de resposta imune contra o vírus pode ser eficientemente induzida por imunização com partículas semelhantes ao vírus (*virus-like particles* ou VLPs), que são formados espontaneamente após a expressão do gene L1 ou L1/L2 em sistemas de expressão heteróloga. Proteínas de papilomavirus têm sido produzidas em vários sistemas para a produção de VLPs. Dentre eles, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem sido amplamente utilizada, oferecendo muitas vantagens em relação a outros sistemas, como por exemplo, a capacidade de realizar modificações pós-traducionais tipicamente associadas aos eucariotos superiores.

Como já existem muitos animais infectados, uma estratégia terapêutica também deve ser considerada. Para tal, a imunização genética tem sido documentada como uma estratégia efetiva para a indução da imunidade humoral e celular num grande número de modelos animais, protegendo o hospedeiro contra novas infecções virais e regredindo lesões já estabelecidas. A vacina de DNA apresenta várias vantagens atraentes como a sua simplicidade na produção, estabilidade térmica e segurança biológica.

Neste trabalho, foi proposto o desenvolvimento de duas estratégias vacinais para o controle das doenças associadas ao BPV. Uma estratégia baseada em vacina de subunidade através da produção da proteína do capsídeo viral L1 em levedura *Pichia pastoris* e uma estratégia baseada em imunização genética usando os genes L2 e E5 de BPV1 como antígenos vacinais.

2. Revisão da Literatura

2.1 Papilomavírus

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

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

Infecção por PV conduz a lesões hiperplásicas, definidas como verrugas, papilomas ou condilomas, em grande variedade de organismos, incluindo a espécie humana (Muñoz, 2000). As lesões causadas são normalmente eliminadas por uma resposta imune celular direcionada contra antígenos virais (O'Brien & Campo, 2002). Porém, se acompanhadas de outras modificações celulares, induzidas por cofatores ambientais, podem evoluir para câncer (Campo, 2002).

2.1.1 Papilomavírus Bovino

Os papilomavírus que infectam naturalmente animais, em especial mamíferos, têm sido estudados como agentes da doença em animais e como modelos de estudo para infecções humanas. Dentre estes papilomavírus se encontra o papilomavírus bovino.

Treze tipos de BPV (BPV 1-13) estão atualmente descritos e supostos novos tipos têm sido sugeridos. Os diferentes genótipos foram classificados em três gêneros. BPV-1, BPV-2 e BPV-13 pertencem ao gênero *Delta-papilomavirus* e exibem um maior espectro de hospedeiros e tropismo por outros tecidos; eles causam fibropapilomas em bovinos e sarcóides em equinos (de Villiers *et al.*, 2004; Lunardi *et al.*, 2013). BPV-3, BPV-4, BPV-6, BPV-9, BPV-10, BPV-11 e BPV-12 pertencem ao gênero *Xi-papilomavirus* englobando os tipos puramente epiteliotrópicos (Hamata *et al.* 2008; 2011; Zhu *et al.*, 2012). BPV-5 e BPV-8 são membros do *Epsilon-papilomavirus* e causam tanto fibropapilomas como papilomas verdadeiros (Tomita *et al.*, 2007). BPV-7 foi isolado de papilomas cutâneos em bovinos e atualmente não está classificado em um gênero de PV (Ogawa *et al.*, 2007) (Figura 1).

A diversidade de papilomavírus pode ser explicada por múltiplos mecanismos evolutivos (Gottschling *et al.*, 2007). A divergência do hospedeiro viral é uma importante força evolutiva, no entanto esta força apenas não pode explicar a evolução dos PVs e sua diversidade. Mecanismos alternativos, como duplicação do vírus no hospedeiro, recombinação ou adaptação viral após mudança de hospedeiro, podem ter contribuído consideravelmente para explicar a diversificação dos PVs (Shah *et al.*, 2010; Gottschiling *et al.*, 2011).

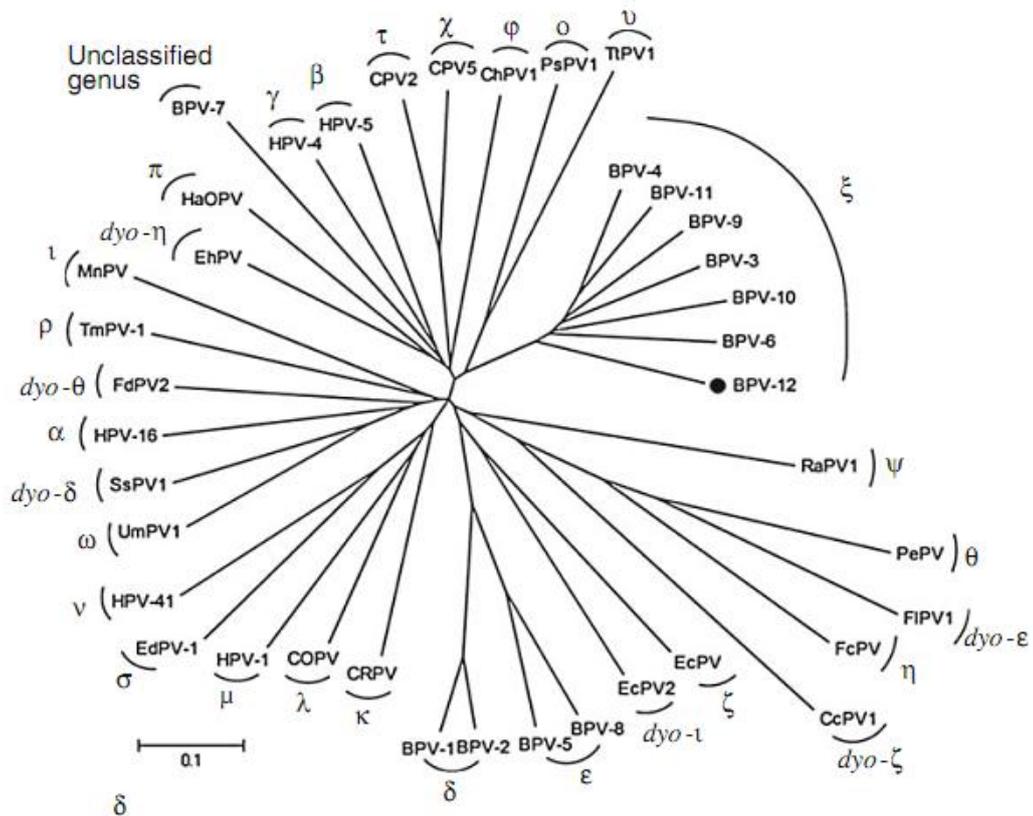


Figura 1. Árvore Filogenética dos papilomavírus. Abreviações: CcPV-1 (*Caretta caretta* PV-1), ChPV-1 (*Capra hircus* PV-1), COPV (Canine Oral PV), CPV (Canine PV), CRPV (Cottontail Rabbit PV), EcPV (*Equus caballus* PV), EcPV-2 (*Equus caballus* PV-2), EdPV-1 (*Erithizon dorsatum* PV-1), EhPV (European hedgehog PV), FcPV (*Fringilla coelebs* PV), FdPV-2 (*Felis domesticus* PV-2), FIPV-1 (*Francolinus leucoscepus* PV-1), HaOPV (Hamster Oral PV), HPV (Human PV), MnPV (*Mastomys natalensis* PV), PePV (*Psittacus erithacus timneh* PV), PsPV (*Phocoena spinipinnis* PV), RaPV-1 (*Rousettus aegyptiacus* PV-1), SsPV-1 (*Sus scrofa* PV-1), TmPV (*Trichechus manatus latirostris* PV), TtPV-1 (*Tursiops truncates* PV-1), UmPV-1 (*Ursus maritimus* PV-1). (Zhu et al., 2012).

2.2 Genoma do Papilomavirus Bovino

O vírion do BPV é uma estrutura icosaédrica não-envelopado, de 55-60 nm de diâmetro que forma arranjos paracrystalinos no núcleo de células infectadas; ele contém um DNA dupla fita covalentemente circular complexo com histonas celulares (Nasir & Campo, 2008).

O genoma do papilomavírus bovino consiste em um DNA de fita dupla circular com cerca de 8000 pares de bases e pode ser dividido em três segmentos: a região LCR (*Long Control Region* ou Região Longa de Controle), que contém os elementos *cis*-regulatórios necessários para a replicação e transcrição do DNA viral, e duas regiões que formam os quadros abertos de leitura (ORF) correspondentes aos genes precoces (E) e tardios (L). As ORFs são classificadas como não-estruturais ou precoces (E, do inglês *early*) e estruturais ou tardias (L, do inglês *late*), de acordo com o período de expressão. O segmento E representa 45% do genoma e codifica para proteínas que são necessárias para a replicação e transcrição do DNA viral e podem subverter a proliferação celular, finalmente induzindo à transformação celular, enquanto que o segmento L codifica para as proteínas que formam a estrutura do capsídeo viral (Campo, 1997; Freitas *et al.*, 2011). A Figura 2 ilustra a organização genômica de BPV-1.

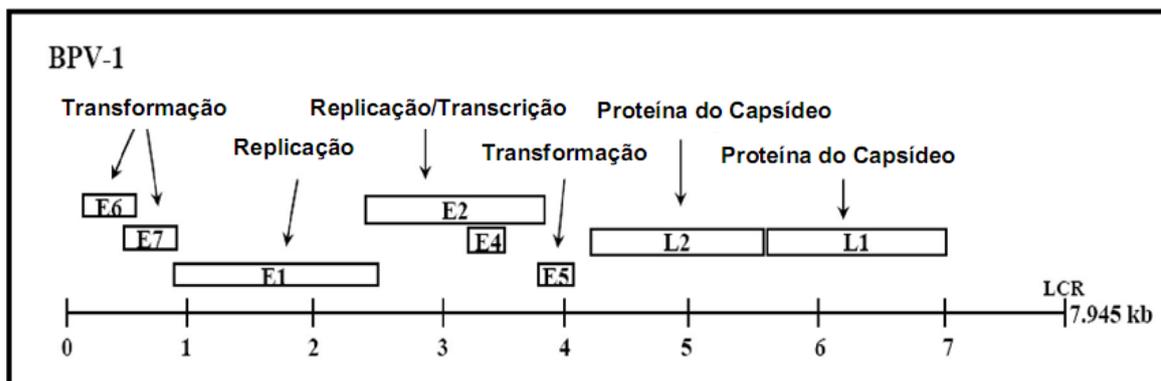


Figura 2. Representação linear do genoma de BPV-1 (adaptado de Campo, 2006).

A região LCR é uma área não codificante do genoma viral que varia de 500 a 1000 nucleotídeos, dependendo do tipo do papilomavírus, situada entre o terminal 3' da ORF tardia e o terminal 5' da ORF precoce. Essa região contém a

maioria ou todos os sinais regulatórios tanto para replicação quanto para a transcrição do DNA viral (Nicholls & Stanley, 2000; Munger & Howley, 2002).

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

A expressão dos genes virais ocorre através de um complexo padrão de eventos de processamento de RNA (*RNA splicing*) que processam um RNAm maduro a partir de um precursor de RNA policistrônico, tanto em Delta- quanto em Xi-BPVs (Jia & Zheng, 2009). Quase todos os transcritos de papilomavírus são policistrônicos. Esses transcritos policistrônicos apresentam sinais de processamento sub-ótimos que são submetidos a extensivos *splicings* alternativos de RNA. *Splicing* de RNA regula a expressão do gene ao nível pós-transcricional e desempenha um papel importante durante o ciclo de infecção do papilomavírus. Como uma regra geral, os transcritos tardios codificando as proteínas estruturais são encontrados apenas nas camadas mais diferenciadas de verrugas e outras lesões produtivas, enquanto que RNAs codificando as proteínas precoces são encontradas tanto em verrugas como em células transformadas (Zheng & Baker, 2006; Jia & Zheng, 2009).

Os genes precoces codificam as proteínas envolvidas tanto nos processos de replicação e transcrição do DNA viral quanto na transformação

celular (Campo, 2006). Os genomas de BPV-3, BPV-4 e BPV-6 perderam a ORF E6, que foi substituída por E5 (originalmente definida como E8), enquanto que a maioria dos tipos de PV, BPV-1, BPV-2 e BPV-5 ainda mantêm esse gene (Borzacchiello & Roperto, 2008).

A proteína E1 tem função na replicação do DNA viral, permite o desenrolar do genoma viral e age como fator de alongação (Lambert, 1991). O produto do gene E2 está envolvido tanto no controle da transcrição quanto na replicação do DNA viral, sendo responsável pelo reconhecimento e ligação da origem de replicação. A proteína E2 existe em duas formas. A proteína íntegra do gene E2 tem a função de reprimir a transcrição em certas condições, já a proteína em sua forma N-terminal atua como ativador transcricional (Yang *et al.*, 1991, Rogers *et al.*, 2011).

Outra relevante função de E2 é a sua capacidade de segregar o genoma episomal 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 (Campo, 2006). 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. Para a associação de E2 com a cromatina mitótica, o estado fosforilado da proteína E2 não é requerido, e é provável que a proteína celular Brd4 seja responsável pela interação de E2 com os cromossomos mitóticos (Feeney *et al.*, 2011).

A ORF E4 codifica uma família de pequenas proteínas que são geradas por *splicing* alternativo e modificações pós-traducionais. Essa proteína encontra-se em abundância no citoplasma de queratinócitos ajudando a fase produtiva de

replicação do DNA viral. Em cultura de células e em infecções naturais, E4 interage com a rede de filamentos de citoqueratinas, onde provavelmente desempenha um papel auxiliar na replicação e liberação do vírus (Doorbar, 1991; Borzacchiello & Roperto, 2008).

2.2.1 Oncoproteínas de BPV

Delta-BPVs codificam três oncoproteínas, E5, E6 e E7, enquanto que os Xi-BPVs carecem do gene E6 e codificam apenas E5 e E7. A relativa importância de cada proteína no processo de transformação celular varia entre os diferentes BPVs. E5 é considerada a principal oncoproteína viral, seguida por E6, com um papel mais modesto desempenhado por E7 (Campo, 2006).

A proteína E6 de BPV é um ativador transcricional, que interage com e inibe o co-ativador de transcrição CBP/p300 e, em fazendo-o também inibe a função do supressor tumoral p53 (Zimmerman *et al.*, 2000), alcançando assim o mesmo resultado que as proteínas E6 de Alfa-HPVs, ou seja, a inativação do ciclo celular e apoptótico detendo as funções de p53. E6 possui a capacidade de transformar fibroblastos e induzir crescimento independente de ancoragem e dissociação das fibras de actina por interação com a proteína de adesão focal paxillina, bloqueando a interação entre paxillina e várias outras proteínas de adesão focal, incluindo vinculina e quinase de adesão focal (Tong *et al.*, 1997).

Alem 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 (Nasir & Campo, 2008). Apesar de sua importância, o Xi-PVs não têm um gene E6, que tem sido substituído por um gene semelhante a E5.

O gene E7 de BPV-1 codifica uma proteína de 127 aminoácidos, que coopera com E5 e E6 na indução de transformação celular. Em células infectadas naturalmente, a expressão de E7 de BPV-1 é observada no citoplasma e nucléolos das células basais e inferiores da camada espinhosa, enquanto que a expressão de E7 de BPV-4 é observada em todas as camadas de papilomas, em todas as fases (Borzacchiello & Roperto, 2008). A proteína E7 de papilomavírus humano (HPV) tipo 16 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).

A função transformante da proteína E7 de BPV-1 foi recentemente demonstrada que se correlaciona com a sua ligação a um alvo celular p600. Proteínas E7 mutantes prejudicam a sua habilidade em se ligar a p600 e perdem a capacidade de transformação celular. Além disso, a diminuição (*knockdown*) de p600 reduz a transformação de células expressando E7 de BPV-1 (DeMasi *et al.*, 2005). Foi recentemente mostrado que E7 de BPV-1 pode inibir *anoikis*, um tipo de apoptose induzida por descolamento das células. A inibição da *anoikis* parcialmente correlaciona-se com a capacidade de aumentar a independência de ancoragem de células transformadas com E6 de BPV-1 (DeMasi *et al.*, 2007).

O gene E5 codifica a maior oncoproteína de BPV, com apenas 44 aminoácidos no BPV-1 e 42 em BPV-4 (Schiller *et al.*, 1986; Pennie *et al.*, 1993). Ambas as proteínas podem ser divididas em dois domínios distintos: um domínio amino-terminal que constitui a maior parte da proteína e consiste em resíduos de aminoácidos fortemente hidrofóbicos ricos em leucina com um único aminoácido

hidrofílico na posição 17 (glutamina em E5 de BPV-1 e asparagina em BPV-4), e um curto domínio carboxi-terminal hidrofílico (Schlegel *et al.*, 1986; Marchetti *et al.*, 2002).

A proteína E5 de BPV-1 foi detectada em nível levemente uniforme em camadas basais e em nível mais elevado nas camadas superiores do epitélio escamoso estratificado em papilomas produtivamente replicando BPV-1 (Burnett *et al.*, 1992).

Essa proteína provoca perturbação nos mecanismos de supressão do crescimento e no controle do ciclo celular. Está localizada nos compartimentos das endomembranas das células, especialmente no aparelho de Golgi, e liga-se a ductina 16 k/subunidade c da ATPase H⁺ vacuolar. A ligação de E5 com 16 kDa perturba a correta montagem da V-ATPase e o bombeamento de H⁺, com persistente alcalinização do aparelho de Golgi e das vesículas endossômicas (Schapiro *et al.*, 2000) e pode conduzir, direta ou indiretamente, a perda acentuada da comunicação célula-célula através da regulação das junções *gap* (Ashrafi *et al.*, 2000), tornando as células transformadas mais insensíveis aos sinais de controle homeostático de crescimento das células normais adjacentes.

A perda da comunicação das junções *gap* em células transformadas com papilomavírus provavelmente contribui para a transformação celular por isolamento das células infectadas das células normais circunvizinhas, permitindo então o estabelecimento de outros eventos de transformação (Nasir & Campo, 2008). A inibição da acidificação dos endossomos e do aparelho de Golgi leva a perturbação do processamento de proteínas celulares, resultando na retenção e reciclagem de receptores de fatores de crescimento celular dos compartimentos endossomais (Campo, 2006).

Outra importante consequência da alcalinização do Complexo de Golgi mediada por E5 é a diminuição da expressão (tanto *in vivo* como *in vitro*) do Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe I (MHC-I), o que representa um dos mecanismos pelos quais o BPV escapa da resposta imune do hospedeiro (Venuti *et al.*, 2011).

Adicionalmente, E5 de BPV interage diretamente e ativa o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R), ativando uma cascata de sinalização intracelular para a proliferação celular (Borzacchiello *et al.*, 2006), e ativa diversas proteínas quinases envolvidas no controle do ciclo celular causando uma desregulação generalizada do programa de proliferação da célula (Nasir & Campo, 2008). E5 de BPV-1 interage com o PDGF β -R através do seu domínio transmembrana.

A Figura 3 ilustra os eventos moleculares provenientes da ação da oncoproteína E5 de BPV-1.

2.2.2 Proteínas do capsídeo de BPV

O genoma viral também contém os genes tardios que codificam as duas proteínas que compõem o capsídeo do vírus. A proteína L1 é a principal proteína do capsídeo viral com peso molecular de 55, representando cerca de 80% do total de proteínas. Já a proteína L2 corresponde a uma pequena porção do capsídeo com peso molecular de 77 kDa (Buck *et al.*, 2005). O capsídeo contém 360 cópias da proteína L1 e provavelmente 12 cópias da proteína L2, organizados em 72 capsômeros icosaédricos (Modis *et al.*, 2002).

no caso de L2 de BPV-2, epítomos de rejeição tumoral (Campo, 2006; Borzacchiello & Roperto, 2008).

Os monômeros de L1 contém 12 β -fitas, 6 loops e 5 α -hélices (h1-h5). Estudos realizados por Bishop *et al.* (2007) demonstram que as α -hélices h2, h3 e h4 localizadas próximas a porção C-terminal de L1 são responsáveis pelas interações interpentaméricas requeridas para montagem do capsídeo. Caracterizações bioquímicas e estruturais de L1 mostram que as α -hélices na região C-terminal tem papel importante no dobramento e montagem do capsídeo. As α -hélices h2, h3 e h5 são essenciais para o dobramento de L1 e formação do pentâmero, enquanto a h4 é indispensável para montagem do capsídeo viral, devido seu papel na interação entre os pentâmeros adjacentes (Bishop *et al.*, 2007).

2.3 Relação Vírus-Hospedeiro

Os papilomavírus replicam e montam suas partículas infecciosas exclusivamente no núcleo. BPV-1 infecta os queratinócitos na camada basal da pele e replica-se no núcleo das células infectadas. Embora os genes virais precoces comecem a ser expressos a partir das células basais indiferenciadas infectadas, os genes virais tardios não são expressos até que as células infectadas entrem no estágio terminal de diferenciação (Zheng & Baker, 2006; Jia & Zheng, 2009).

Os PVs estabelecem seu ciclo de infecção produtiva exclusivamente no epitélio estratificado da pele ou mucosa, sendo esse intrinsecamente relacionado aos estágios de diferenciação das células epiteliais do hospedeiro (O'Brien &

Campo, 2002), como mostra a Figura 4. A replicação viral ocorre nas camadas basais do epitélio escamoso estratificado da pele ou de membranas mucosas e, provavelmente, os vírus têm acesso às células do nível inferior através de lesão e/ou abrasão. A infecção começa com a ligação do vírus aos HSPGs. Supõe-se que esta ligação conduz a uma mudança conformacional nos HSPGs que permite a ligação a um receptor secundário, provavelmente um complexo de integrina (Evander *et al.*, 1997; Selinka *et al.*, 2003). Pós-ligação, um evento de clivagem por furina permite ao BPV-1 entrar nas células via endocitose mediada por clatrina endolisossomal, seguido por tráfego viral para uma vesícula caveolina-1-positiva de pH neutro e, subsequentemente, o retículo endoplasmático (Day *et al.*, 2003; Richards *et al.*, 2006; Laniosz *et al.*, 2008).

O cenário mais provável para a entrada do PV inclui a ligação do vírion a superfície celular mediada por HSPGs. Essa ligação primária é dependente apenas de L1 e não necessita de L2. Um longo atraso na internalização é acompanhado por alterações no modo de ligação e possível transferência para um receptor secundário. A situação mais provável é que as mudanças conformacionais em L2 que ocorrem na superfície da célula são necessárias para expor um sítio de ligação secundário. A interação do capsídeo com HSPG induz alterações conformacionais que resultam da exposição da porção amino-terminal de L2. A exposição dessa porção permite o acesso a sítios de reconhecimento de furina convertase altamente conservados e a subsequente clivagem por furina, que é essencial para o sucesso da infecção (Gambhira *et al.*, 2009; Horvath *et al.*, 2010).

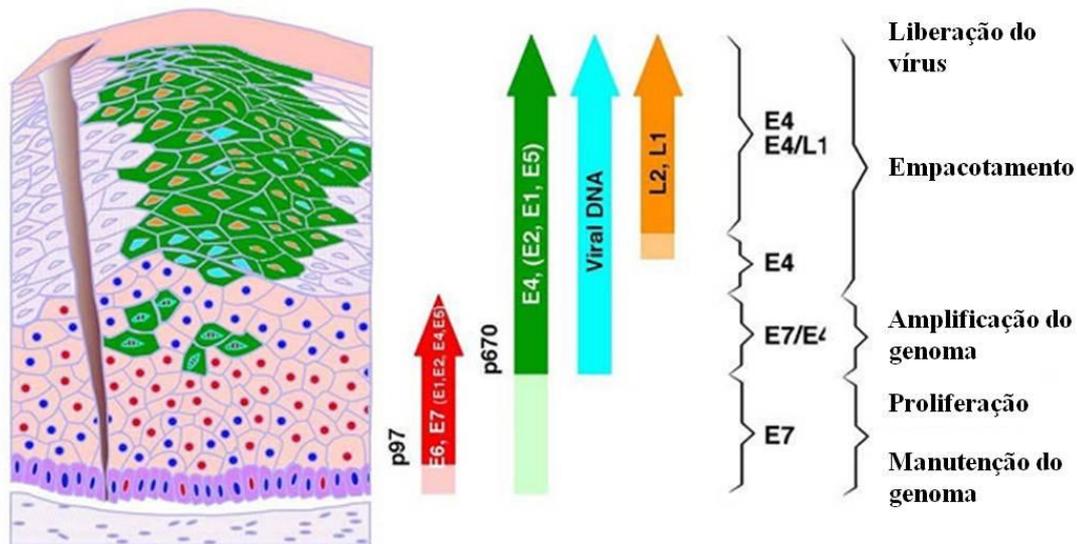


Figura 4. Expressão gênica do PV na infecção produtiva. O epitélio diferenciado está representado esquematicamente no lado esquerdo, e os marcadores expressos são representados como setas à direita. Entrada do vírus no tecido epitelial através de microtrauma e estabelecimento da infecção na camada basal. As proteínas E6 e E7 (núcleos vermelho) são expressas nas camadas epiteliais inferiores (seta vermelha). Os círculos azuis escuro representam núcleos de células não infectadas ou não permissivas. A expressão de E4, e presumivelmente de outras proteínas (verde) cujos genes estão a jusante do promotor tardio dependente de diferenciação (seta verde), é disparada antes do fim da expressão de E6 e E7. A expressão das proteínas do capsídeo do vírus (L1 e L2) (seta cor laranja) segue a conclusão da amplificação do genoma e ocorre em um subconjunto de células que expressam E4 (adaptado de Zheng & Baker, 2006).

A infecção, desencapsidação, e entrada do DNA de PV no núcleo da célula são seguidas pela ativação do promotor localizado na região reguladora a montante (*upstream*) que inicia a expressão das proteínas precoces (proteínas E). Duas delas, E1 e E2, orientam os fatores de replicação da célula hospedeira para a origem de replicação viral, resultando em um aumento inicial rápido do número de cópias do genoma viral por célula (Kadaja *et al.*, 2009). O vírus infecta os queratinócitos basais expressando os genes virais precoces nas camadas basal e suprabasal do epitélio e replica seu genoma durante a diferenciação da camada espinhosa e granular. Com a diferenciação das células, a expressão dos genes tardios é ativada e as proteínas do capsídeo viral L1 e L2, juntamente com a proteína E4 (possivelmente relacionada com a replicação e a encapsidação do

DNA viral) nas camadas escamosas. Os vírions são formados e finalmente liberados com a descamação da camada queratinizada (O'Brien & Campo, 2002). Este gradiente de replicação e diferenciação do epitélio basal para o epitélio apical tem implicações significativas para a detecção e o tratamento das infecções relacionadas ao PV (Howley & Lowy, 2001), uma vez que é difícil a reprodução fiel desse ambiente em cultivo celular.

Assim como muitos vírus, BPVs podem estabelecer uma infecção latente. O genoma viral pode ser frequentemente encontrado em epitélios normais, sem sinais clínicos da doença (Ogawa *et al.*, 2004). Epitélios normais são sítios aceptores de infecção latente e, aliás, a reativação do BPV em locais de trauma sugere que o DNA viral está presente nestes sítios em forma latente, e que os danos do epitélio, possivelmente através da produção de citocinas inflamatórias e do estímulo da proliferação celular, induz a expressão de genes virais levando à formação de papiloma (Campo, 2006). No entanto, epitélios podem não ser o único sítio de latência do papilomavírus. DNA de BPV está presente em forma episomal nos linfócitos circulantes de bovinos (Freitas *et al.*, 2003).

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 sexo e raças, sendo mais frequente em animais com menos de dois anos de idade (Corrêa & Corrêa, 1992). Infecções por Delta-PV levam a transformação de fibroblastos subepiteliais, seguidos por acantose epitelial e papilomatoses, infecções por Xi-PV induzem transformação apenas em células epiteliais,

enquanto que Epsilon-PV causa tanto fibropapilomas como papilomas epiteliais (Borzacchiello & Roperto, 2008).

As lesões hiperplásicas produzidas pelos papilomavírus, definidas como verrugas, papilomas ou condilomas, são geralmente lesões benignas (Muñoz, 2000). No entanto, bovinos podem apresentar processos neoplásicos derivados da malignização de papilomas pré-existentes, devido à ação sinérgica de cofatores ambientais (Campo, 2002; Leal *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2011).

BPVs têm sido descritos como agentes causadores de lesões específicas em locais distintos dos bovinos. BPV-1 causa fibropapilomas nos tetos e no pênis; BPV-2 tem sido descrito como o agente de verrugas comuns e fibropapilomas no esôfago; BPV-3 e BPV-8 em papilomas epiteliais da pele; BPV-4 tem sido descrito como agente de papilomas do canal alimentar, mostrando especificidade para o epitélio mucoso; BPV-5 causa fibropapilomas em forma de arroz no úbere; BPV-6 tem sido isolado em papilomas nos tetos; e BPV-9 e BPV-10 têm sido associados a papilomas epiteliais escamosos do úbere (Campo, 1997; Borzacchiello & Roperto, 2008).

As tetas e o úbere das vacas estão sujeitos à infecção por três diferentes tipos de BPV. A doença torna-se não apenas um problema de saúde, mas também causa grandes consequências econômicas, já que as vacas ficarão impossibilitadas de amamentar os bezerros e, além disso, os papilomas podem fechar os canais das tetas tornando o local propenso para infecção por bactérias (Campo, 1998). Os animais também podem desenvolver papilomas extensivos no trato gastrointestinal superior e, conseqüentemente, apresentar dificuldade para se alimentar e respirar, resultando em um animal debilitado que pode vir a morrer (Campo, 1997).

Apesar de serem reconhecidamente vírus epiteliotrópicos, DNA de BPV já tem sido isolado no sangue periférico, leite, urina, fluido seminal e células de esperma de animais infectados com BPV-1, -2 e -4 (Carvalho *et al.*, 2003; Freitas *et al.*, 2003; Roperto *et al.*, 2008, Lindsey *et al.*, 2009), sendo sugerida a transmissão vertical de BPV-1 e -2. No sangue periférico, Stocco dos Santos *et al.* (1998) sugeriram a ação do BPV sobre a cromatina hospedeira, causando alterações cromossômicas características como fusões cêntricas.

2.5 Papilomavírus Bovino e Câncer

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

Cofatores, sejam ambientais ou genéticos, são necessários para as lesões induzidas por papilomavírus progredirem para câncer. Brotos de samambaia (*Pteridium aquilinum*) têm sido identificados como um dos principais cofatores ambientais na carcinogênese induzida por BPV em bovinos. Os brotos

de samambaia contêm imunossupressores e um número considerável de mutágenos, como a quercetina (Campo, 2002; Nasir & Campo, 2008).

A imunossupressão induzida pela samambaia está associada com duas alterações hematológicas marcantes. A primeira delas é uma queda dramática nos leucócitos polimorfonucleares. Se não checada, ela pode levar a uma imunossupressão aguda grave com invasão da corrente sanguínea por bactérias alimentares e a morte por septicemia. O segundo efeito da alimentação com samambaia é uma queda crônica nos linfócitos circulantes. Mesmo durante os períodos sem a presença da samambaia, a contagem dos linfócitos permanece muito baixa (Campo, 2006).

Além das verrugas comumente associadas, BPV-1 e -2 também estão implicados em lesões neoplásicas. BPV-2, e menos comumente BPV-1, estão relacionados ao processo carcinogênico da bexiga urinária e estabelece uma infecção abortiva, com ausência de produção de vírions (Borzacchiello *et al.*, 2003). O DNA viral nas lesões de bexiga ainda é infeccioso e capaz de iniciar um ciclo replicativo em ambientes permissivos da pele, como mostrado pela capacidade de extratos de câncer de bexiga urinária poder induzir verrugas de pele. Eles estão comumente associados com uma síndrome conhecida como hematúria enzoótica, a qual é causada pela ingestão prolongada de brotos de samambaia (Confer & Panciera, 2001).

Os animais alimentados com samambaia desenvolveram câncer de bexiga urinária tanto de origem epitelial como vascular ocorrendo principalmente em conjunto na mesma bexiga. DNA de BPV-2 foi encontrado em 69% dos tumores induzidos experimentalmente e em 46% dos naturalmente ocorridos. A exposição a agentes imunossupressores, mutagênicos e carcinogênicos da

samambaia desencadeia a expressão gênica do vírus, levando à transformação celular e iniciando a progressão para malignidade (Campo, 1997).

O BPV-4 infecta o epitélio da mucosa gastrointestinal (GI) superior e induz a formação de papilomas pela expressão de suas proteínas transformantes. Os órgãos mais comumente afetados são faringe, esôfago, rúmem e retículo. Animais que desenvolvem papilomatose extensiva têm dificuldade de comer e respirar e são descartados. Porém, se a doença não é tão severa, os animais sobrevivem, mas apresentam alto risco de desenvolverem carcinoma de células escamosas (Campo, 2002).

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

2.6 Sarcóide Equino

BPVs são considerados espécie-específicos e, mesmo em condições experimentais, não infectam nenhum outro hospedeiro além daquele que lhe é

natural. O único caso conhecido de infecção cruzada é a ocorrida entre cavalos e outros equídeos pelo BPV-1 e -2 (Nasir & Reid, 1999; Campo, 2002).

O sarcóide equino é o tumor de pele mais comumente detectado em equinos em todo o mundo e tem sido relatada sua presença em cavalos, burros e mulas (Goldschmidt & Hendrick, 2002), com relatos de taxas de prevalência de 12.9 a 67% de todos os tumores de equinos. O trabalho de Olson e Cook (1951) foi a primeira tentativa de demonstrar uma associação com o papilomavírus bovino. Eles mostraram que a inoculação intradérmica de verruga bovina em cavalos pode dar origem a lesões parecidas com sarcóide, entretanto, a maioria das lesões regrediu espontaneamente, o que é raramente visto em sarcóides naturais. Um animal, no entanto, desenvolveu um tumor recorrente, compatível com sarcóide.

BPV (tipo 1 e menos comumente, tipo 2) está envolvido na patogênese do sarcóide com a grande maioria dos tumores portando DNA de BPV episomal (não integrado no genoma da célula) (Nasir & Campo, 2008). O sarcóide pode ser definido como tumores fibroblásticos benignos localmente agressivos da pele equina e pode ocorrer como lesões únicas ou múltiplas em diferentes formas, desde pequenas lesões parecidas com verrugas até grandes úlceras fibrosas. As lesões podem ocorrer em todo o corpo, mas existem sítios de predisposição em especial na região paragenital, no tórax-abdome e na cabeça e, frequentemente, ocorrem em locais de lesão prévia e cicatrizes (Torrontegui & Reid, 1994).

A biologia molecular da infecção pelo BPV-1 em sarcóide equinos assemelha a da infecção por BPV-2 na bexiga urinária em bovinos: em ambos os casos, a infecção é abortiva e não produtiva, as proteínas precoces, incluindo a principal oncoproteína E5, são consistentemente expressas, fornecendo

evidências claras que a presença do DNA viral não é acidental; as proteínas tardias são ocasionalmente detectadas, mas não se observa partículas virais, sugerindo que a infecção é abortiva numa fase tardia (Chambers *et al.*, 2003; Nasir & Campo, 2008).

Sarcóides equinos têm um notável impacto sobre a saúde e bem-estar equino, e apresentam um encargo financeiro significativo para os proprietários. Isto é particularmente verdadeiro nos países em desenvolvimento, onde os burros são uma grande parte da economia agrária. Até o momento, nenhuma predileção por sexo tem sido relatada, porem, um aumento da incidência tem sido relatado em animais jovens e a incidência bruta do sarcóide em burros tem sido estimada em 0,6 casos/animal/ano (Torrontegui & Reid, 1994).

2.7 Resposta Imune ao Papilomavírus

Os vírus devem ser capazes de superar a resposta imune do hospedeiro para se replicarem e produzirem sua progênie infecciosa. No entanto, apesar da capacidade do vírus de escapar da vigilância imune, eventualmente, o hospedeiro monta uma resposta imunológica eficaz e culminando com a eliminação das células infectadas pelo vírus (Nasir & Campo, 2008).

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

O fracasso do sistema imunitário em reconhecer a presença do vírus ou de sua progênie deve-se ao fato de que os papilomavírus possuem um ciclo de infecção restrito ao epitélio e, portanto, não estão em contato com o sistema imunológico (O'Brien & Campo, 2002). Essa interpretação é apoiada pelo fato de que, em animais de campo, úlceras e tumores têm altos títulos de anticorpos naturais anti-BPV e uma boa resposta de anticorpos pode ser obtida após a inoculação intramuscular com vírus purificado ou proteínas virais, confirmando que apenas quando o papiloma estiver danificado, ou um limiar de natureza desconhecida é alcançado através de imunização, os antígenos virais entram em contato com as células imunes (Campo, 1998).

A resposta imune pobre para o BPV parece ser uma das principais razões da persistência de infecção: mesmo em hospedeiros imunocompetentes, os papilomas persistem por vários meses antes de ocorrer regressão. Recentemente, tem se tornado claro que, além da imunoevasão passiva devido ao ciclo de infecção viral ser confinado ao epitélio, os papilomavírus têm desenvolvido vias ativas para esquivar-se do sistema imune do hospedeiro (Campo, 2006). Entre elas, encontra-se a regulação do MHC-I por E5, que ocorre em vários níveis: a transcrição do gene da cadeia pesada (*heavy chain*) do MHC-I é reduzida, o peptídeo da cadeia pesada 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 (Venuti *et al.*, 2011).

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, 1997). Embora a grande maioria das lesões eventualmente regrida, a resposta imune do hospedeiro frente aos antígenos virais é surpreendentemente pobre, com pouca ou nenhuma resposta humoral ou celular detectada. Alguma resposta imune pode ser normalmente detectada somente nos estágios tardios da infecção ou quando as lesões progridem para processos malignos (Konya & Dillner, 2001).

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

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

2.8 Estratégias de Imunização

Papilomavírus não podem ser cultivados em laboratório para produção de vírions ou proteínas virais, que seriam fonte de antígenos para testes sorológicos e desenvolvimento de vacinas convencionais de vírus inativos (Da Silva *et al.*, 2001). Por essa razão, as vacinas contra papilomavírus atualmente em desenvolvimento empregam a tecnologia da engenharia genética.

Vários estudos testaram a eficácia de vacinas contra infecções por PV baseados nos produtos dos genes estruturais e não-estruturais do vírus (Hu *et al.*, 2002). As vacinas terapêuticas são baseadas na indução de imunidade celular contra células expressando antígenos virais, visando a regressão das lesões. As proteínas não-estruturais, principalmente E6 e E7, são os alvos dessas vacinas, uma vez que são muito expressas em células de tumores associados a papilomavirose (Han *et al.*, 1999; Münger *et al.*, 2001). Contudo, a principal proteína dos BPVs 1 e 2, relacionada à transformação celular é E5 (Campo, 2006).

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

grande maioria destes é produzida por VLPs formadas por apenas L1 ou L1/L2 (Schiller & Lowy, 2001).

Vacinas de L1 de BPV-2 induzem a produção de anticorpos neutralizantes contra o vírus e previnem a infecção (Jarrett *et al.*, 1991). Um efeito semelhante foi obtido com L1 de BPV-1 que protegeu bezerros contra desafio por BPV-1 após a vacinação (Pilacinski *et al.*, 1986). Contudo, vacinas de L2 de BPV-2 induzem regressão das verrugas nas quais há grande infiltração de linfócitos e macrófagos.

Vacinas de L2 de BPV-2 não proporcionam proteção contra desafio viral, mas induzem a regressão precoce de verrugas; anticorpos contra o antígeno são gerados nos animais vacinados, mas eles não são neutralizantes. Grandes infiltrados de linfócitos e macrófagos são observados nas verrugas em regressão, indicando uma resposta imune celular (Campo, 1997).

2.8.1 Virus-like particles

O desenvolvimento de uma estratégia vacinal para fins profiláticos tem como base o uso de sistemas que simulasse o vírion selvagem e desta forma estimulasse a produção de anticorpos neutralizantes pelo hospedeiro. A capacidade intrínseca das proteínas que formam o capsídeo de alguns vírus, entre eles o papilomavírus, de se organizarem depois de expressas em sistemas recombinantes (constituindo o que se denominou de VLP), tem proporcionado este desenvolvimento vacinal (Figura 5) (Noad & Roy, 2003; Garcea & Gissmann, 2004).

As VLPs são indistinguíveis dos vírions nativos e preservam os epítomos conformacionais necessários à indução de anticorpos neutralizantes e também são capazes de promover resposta celular (Dupuy *et al.*, 1999; Palker *et al.*,

2001). Por não conterem o genoma viral, estas VLPs não são infecciosas ou oncogênicas e representam, portanto, uma excelente estratégia para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra os papilomavírus (da Silva *et al.*, 2001). Embora L2 apresente alguns epítomos capazes de induzir produção de anticorpos neutralizantes, a grande maioria destes é produzida por VLPs formadas por apenas L1 ou L1/L2 (Schiller & Lowy, 2001). Quando expressa em sistemas eucarióticos e em alguns sistemas procarióticos, L1 possui uma propriedade intrínseca de auto-montar em VLPs (Kirnbauer *et al.*, 1992; Aires *et al.*, 2006).

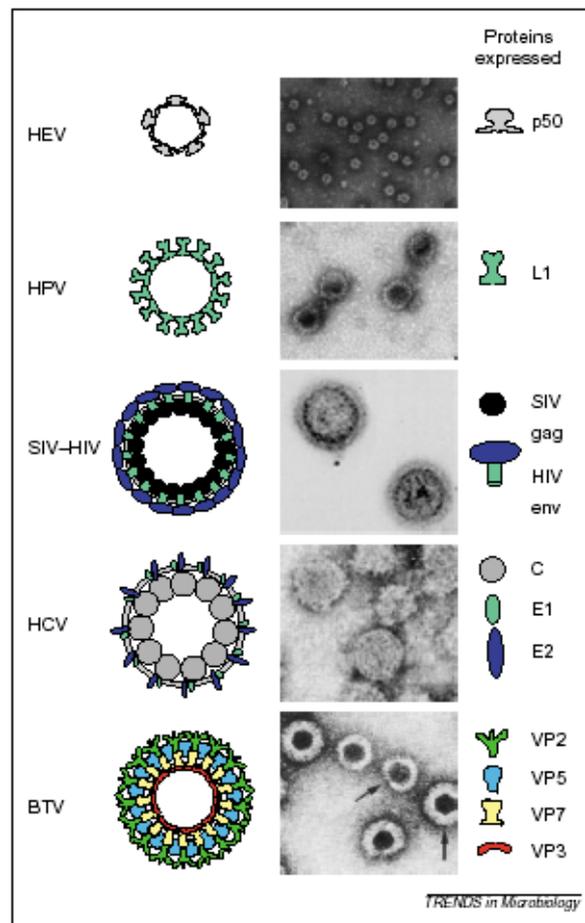


Figura 5. Estrutura de VLPs para uma variedade de vírus. A morfologia do capsídeo e as proteínas expressadas para obtenção da VLP são ilustradas. Em cada caso a microscopia eletrônica da VLP produzida é mostrada. Abreviações: BTV – vírus da língua azul; HCV – vírus da hepatite C; HEV – vírus da hepatite E; HPV – papilomavírus humano; SIV HIV – VLP híbrida entre vírus da imunodeficiência dos símios (gag) e vírus da imunodeficiência humana (env) (Noad & Roy, 2003).

Em alguns casos, VLPs parecem não requerer o uso de adjuvantes para alcançar forte estimulação imune. Os efeitos auto-adjuvantes dessas VLPs são inerentes por sua tendência em ter um tamanho adequado para fagocitose pelas células dendríticas, para processamento e apresentação pelo MHC de classe II, assim como promover diretamente a maturação e migração de células dendríticas, essenciais para a estimulação da resposta imune inata (Fifis *et al.*, 2004; Gamvrellis *et al.*, 2004).

A eficiência das VLPs na indução da resposta imune e prevenção da infecção por papilomavírus foi primeiramente testada em modelos animais, como canino (Suzich *et al.*, 1995), leporino (Breitburd *et al.*, 1995) e bovino (Kirnbauer *et al.*, 1996).

2.8.2 Vacina de DNA

As vacinas gênicas 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).

O princípio da ação das vacinas de DNA está ilustrado na figura 6. Basicamente, o DNA codificando um antígeno vacinal é clonado num vetor plasmidial e liberado no organismo por uma variedade de rotas, incluindo injeção intramuscular. O antígeno é produzido dentro das células do organismo vacinado e, portanto, usa a maquinaria transcricional do hospedeiro. A proteína vacinal

(contendo os epítopos íntegros) é reconhecida pelo sistema imunológico e promove uma resposta imune. Desta forma, as vacinas de DNA atuam de forma semelhante às vacinas virais atenuadas, sendo capazes de efetivamente induzirem resposta humoral e celular (Dunham, 2002).

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.*, 2004a) 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.*, 2007a). 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).

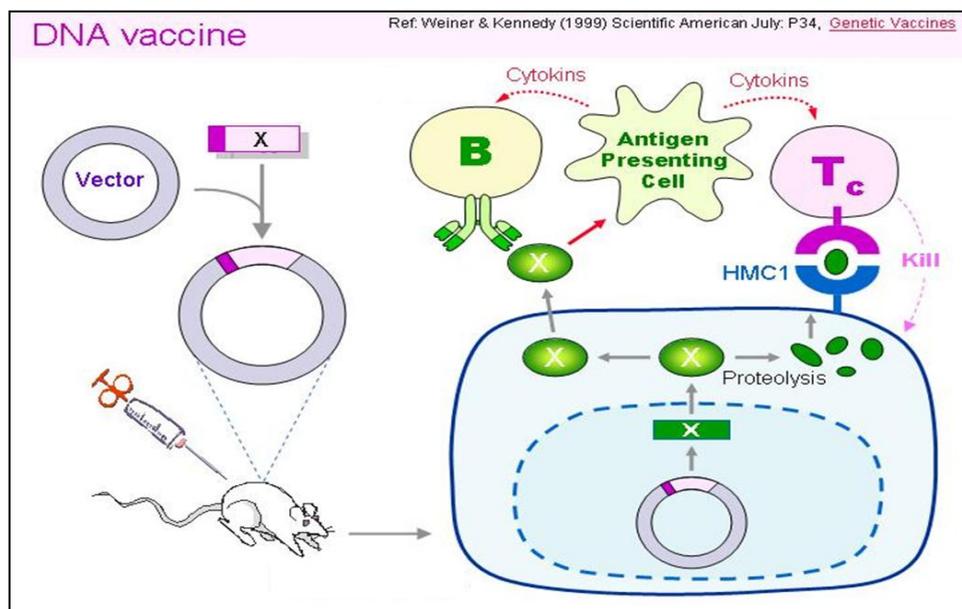


Figura 6. Representação da ação das vacinas de DNA. O gene de interesse X é clonado em vetor plasmidial e inoculado no organismo. Dentro da célula do hospedeiro, o gene é codificado, processado e reconhecido pelo sistema imune (células B ou T citotóxicas) (Weiner & Kennedy, 1999).

A imunização genética também tem sido documentada como uma estratégia efetiva para a indução de imunidades humoral e celular num grande número de modelos animais, como os exemplos vistos em ovinos (Candido *et al.*, 2003), suínos (Gerdtts *et al.*, 1997), caninos (Suzich *et al.*, 1995), coelhos (Hu *et al.*, 2002), entre outros. No caso de bovinos há estudos envolvendo BHV-1 (Herpesvírus bovino tipo 1), BRSV (Vírus Sincicial Respiratório Bovino) e BVDV (Vírus da Diarréia Bovina) (Schrijver *et al.*, 1997).

A vacinação de bezerros com a proteína E7 de BPV-4 não previne a infecção. Entretanto, nos animais vacinados, o desenvolvimento de papiloma é mais lento e a duração da papilomatose mais curta do que nos animais controle. Em animais vacinados, papilomas não atingem o estágio final de desenvolvimento e começam a regredir numa fase anterior (Campo *et al.*, 1993). Os animais vacinados produzem altos títulos de anticorpos dirigidos para três epítomos de células B imunodominantes (Chandrachud *et al.*, 1994) e desenvolvem uma forte resposta imune celular para dois epítomos de células T (McGarvie *et al.*, 1995).

A imunidade é conferida pela porção N-terminal de L2 (Chandrachud *et al.*, 1995) e os animais vacinados desenvolvem anticorpos neutralizantes contra o vírus (Gaukroger *et al.*, 1996). Três epítomos de células B imunodominantes foram identificados na porção N-terminal de L2 (Knowles *et al.*, 1997), e um único peptídeo de 20 aminoácidos de comprimento (resíduo 131-151) correspondendo a um dos epítomos é suficiente para uma proteção total da infecção (Campo *et al.*, 1997).

A despeito das informações da literatura não existe até o momento produto algum para o controle tanto da papilomatose bovina como para o sarcóide

equino, bem como nenhuma vacina (profilática ou terapêutica), seja experimental ou comercial.

2.9 Sistemas de Expressão Heteróloga

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

A bactéria *Escherichia coli* tem sido exaustivamente utilizada como hospedeiro recombinante por várias razões, incluindo: facilidade de rápida e precisa modificação do genoma, crescimento rápido até altas densidades celulares, facilidade de cultivo em meios de baixo custo e facilidade de redução de atividade protease. *E. coli* pode acumular proteínas heterólogas em até 50% de seu peso celular seco (Swartz, 1996). Entretanto, há muitas desvantagens, tais como a inabilidade para modificações pós-traducionais, presença de pirógenos tóxicos na parede celular e formação de corpos de inclusão contendo a proteína heteróloga insolúvel e agregada (Demain & Adrio, 2008).

Como um sistema de expressão, as leveduras oferecem vantagens distintas sobre outros sistemas de expressão, tanto em termos de capacidade e produtividade, bem como a segurança comprovada de proteínas virais derivadas de leveduras para aplicações farmacêuticas (Morton & Potter, 2000).

Comparada à expressão em *E. coli*, a produção de proteínas heterólogas em leveduras permite um processamento mais similar ao encontrado em células animais, pois o ambiente intracelular da levedura é mais adequado para ocorrência de várias reações que normalmente acontecem em células de mamíferos, como certas modificações pós-traducionais, tais como glicosilações e fosforilações (Daly & Hearn, 2005).

O sistema de expressão em células de levedura contorna também várias das dificuldades encontradas em outros sistemas de expressão eucarióticos. Cultura de células de insetos e células de mamíferos são empregadas satisfatoriamente como sistemas de expressão heterólogo. No entanto, apresentam algumas desvantagens: crescimento em meios caros, baixo nível de expressão, manutenção complexa e processo de purificação complexo (Shuler & Kargi, 2001; Montor & Sogayar, 2003).

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* são amplamente utilizadas como sistema de expressão heteróloga (Gellissen, 2000).

2.10 Levedura *Pichia pastoris*

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

P. pastoris é uma das aproximadamente 30 espécies de levedura representadas em 2 gêneros diferentes (*Pichia* e *Candida*) capazes de

metabolizar metanol (Kurtzman & Robnett, 1998). A via metabólica do metanol parece ser a mesma em todas as leveduras e envolve um único conjunto de vias enzimáticas. O primeiro passo no metabolismo do metanol é a oxidação do metanol a formaldeído, gerando peróxido de hidrogênio, pela ação da enzima álcool oxidase (AOX). Para evitar a toxicidade causada pelo peróxido de hidrogênio, esse primeiro passo ocorre dentro de uma organela celular especializada, chamada peroxissomo, que converte o produto tóxico a água e oxigênio pelas catalases presentes nesta organela (Cregg *et al.*, 2000). Uma porção do formaldeído, gerado pela AOX, deixa o peroxissomo e é oxidada a formato e dióxido de carbono por duas desidrogenases citoplasmáticas, reações que são fonte de energia para o crescimento celular em metanol. O formaldeído que permanece no peroxissomo é utilizado como precursor de constituintes celulares. As principais reações envolvidas no metabolismo do metanol estão indicadas na figura 7.

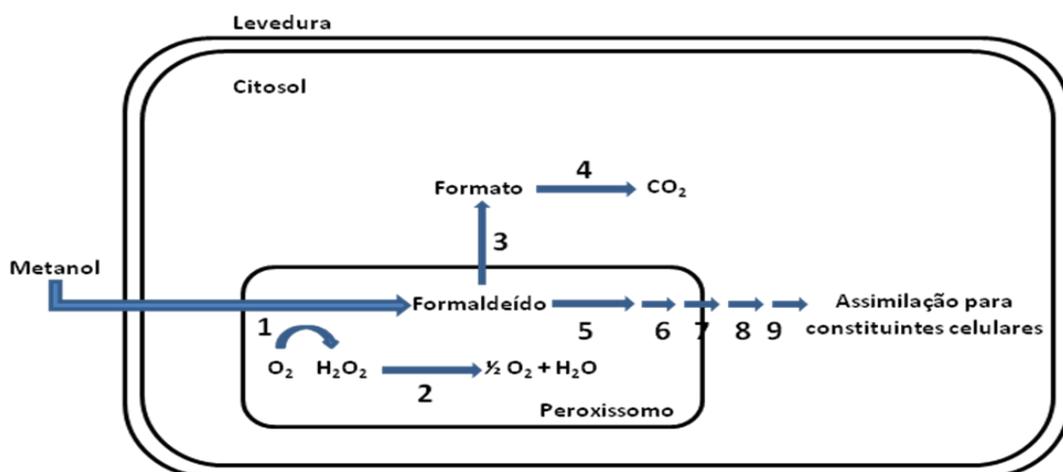


Figura 7. Metabolização do metanol em *P. pastoris*. 1. Álcool oxidase; 2. Catalase; 3. Formaldeído desidrogenase; 4. Formato desidrogenase; 5. Deidroxiacetona sintetase; 6. Deidroxiacetona quinase; 7. Frutose-bifosfato aldolase; 8. Frutose bifosfatase; 9. Formaldeído redutase. Fonte: adaptada Zhang *et al.* (2000) e Houard *et al.* (2002).

A enzima tem uma baixa afinidade por O₂, o que é compensado pela produção de grandes quantidades, chegando a mais de 30% das proteínas solúveis totais nas células cultivadas em metanol (Cereghino & Cregg, 2000; Gellissen *et al.*, 2005).

Existem dois genes que codificam a álcool oxidase em *P. pastoris*, *AOX1* e *AOX2*, porém o *AOX1* é responsável pela maioria da atividade da enzima álcool oxidase na célula. A expressão do gene *AOX1* é fortemente regulada e induzida por metanol a altíssimos níveis. O promotor do gene *AOX1* é fortemente reprimido em células cultivadas com glicose e outras fontes de carbono, mas é induzido mais de 1000 vezes quando são transferidas para meios contendo metanol como única fonte de carbono (Cereghino, 2002). A capacidade de indução do promotor *AOX1* pelo metanol pode, portanto, ser usada para direcionar a expressão de proteínas recombinantes em altos níveis até mesmo com a integração de uma única cópia do cassete de expressão (Daly & Hearn, 2005).

Embora o promotor *AOX* venha sendo usado com muito sucesso para direcionar a expressão de várias proteínas recombinantes, existem algumas circunstâncias em que essa produção não seria muito conveniente, devido à necessidade de metanol para indução da expressão. Nesses casos, uma boa alternativa seria a utilização de promotores constitutivos que utilizem fonte de carbono diferente, entre eles estão os promotores *GAP*, *FLD1*, *PEX8*, *YPT1* e *PGK1*.

Sistemas que utilizam vetores com o promotor *GAP* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) necessitam de glicose como fonte de carbono e são amplamente utilizados apresentando níveis de expressão semelhantes ou até maiores daqueles observados com o promotor *AOX1* (Vassileva *et al.*, 2001),

porém, por ser constitutivo, ele só é apropriado para proteínas recombinantes que não sejam tóxicas às células. O promotor *FLD1* é originado do gene que codifica a enzima formaldeído desidrogenase que participa do metabolismo do metanol. Ele pode ser induzido por metanol, metilamina ou ambos, o que resulta em um alto nível de produção (Resina *et al.*, 2004). Já os promotores *YPT1*, induzido por manitol (Sears *et al.*, 1998) e construído a partir do gene da GTPase, e o *PEX8*, proteína da matriz peroxisomal (Liu *et al.*, 1995), não são muito utilizados, provavelmente pelos baixos níveis de expressão obtidos (Cregg *et al.*, 2000).

O promotor *PGK1* tem origem no gene da enzima 3-fosfoglicerato quinase. Essa enzima participa da via glicolítica (representando cerca de 30-60% do total de proteínas solúveis), transferindo o grupo fosfato do 1,3-bifosfoglicerato para o ADP, formando ATP e 3-fosfoglicerato. Esta enzima também atua na via gliconeogênica e pode constituir cerca de 5% do total de proteínas celulares, sendo a enzima constitutivamente expressa e seu promotor considerado forte (Holland & Holland, 1978). Um esquema das vias glicolítica e gliconeogênica é mostrado na figura 8.

Devido aos altos níveis de expressão, esse promotor tem sido isolado e utilizado na construção de vetores de expressão em várias leveduras e fungos filamentosos como, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* (Grange *et al.*, 1996), *Candida maltosa* (Masuda *et al.*, 1994), *Yarrowia lipolytica* (Dall *et al.*, 1996), *Kluyveromyces lactis* (Fournier *et al.*, 1989) e *Aspergillus nidulans* (Streatfield *et al.*, 1992).

O gene *PGK1* de *P. pastoris* foi isolado e caracterizado por Almeida *et al.* (2005). Tal promotor tem mostrado altos níveis de expressão quando as células são crescidas em glicose e comparadas com crescimentos em glicerol e metanol

(Almeida *et al.*, 2005). Já foi relatado o uso do promotor *PGK1* de *P. pastoris* para a produção de α -amilase de *Bacillus subtilis* (Almeida *et al.*, 2005; Arruda, 2008) e quimosina de *Bos Taurus* (Araújo, 2008). Nos três trabalhos, a produção das proteínas recombinantes sob controle do promotor *PGK1* se mostrou igual ou superior àquelas controladas pelo promotor *AOX1*.

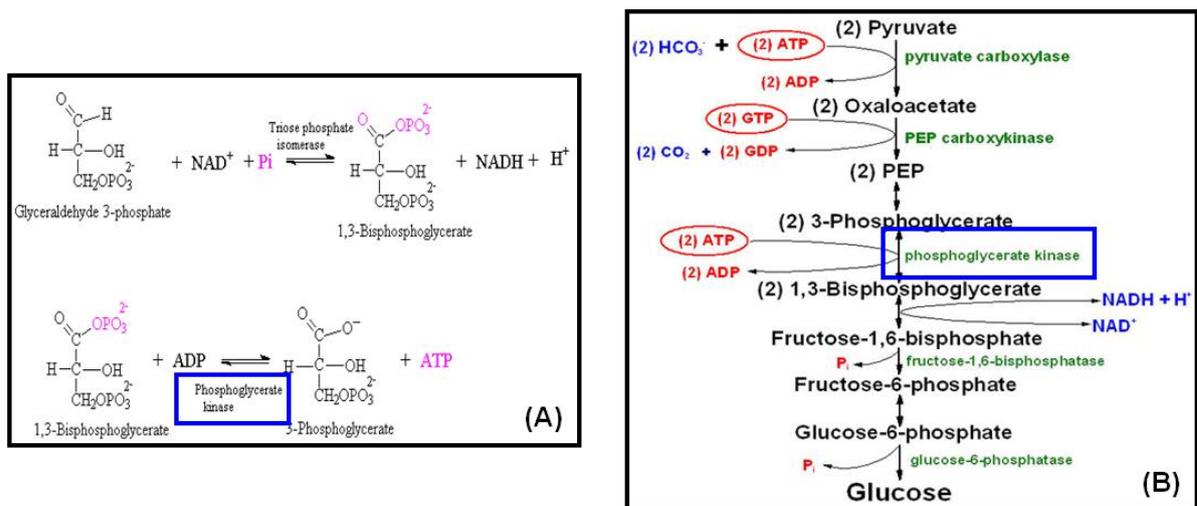


Figura 8. Ilustração das vias glicolítica e gliconeogênica. (A) Esquema de parte da via glicolítica com ênfase para formação de ATP e 3-fosfoglicerato mediada pela enzima 3-fosfoglicerato quinase; (B) Esquema da via gliconeogênica, enfatizando a ação da enzima 3-fosfoglicerato quinase.

Nos últimos anos, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* tem sido usada com grande sucesso como sistema de expressão na qual aproximadamente 300 proteínas heterólogas diferentes já foram produzidas (Cereghino & Cregg, 2000). Tal sistema de expressão apresenta características peculiares que exercem muitas vantagens sobre outros sistemas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). A maior vantagem de *P. pastoris* sobre sistemas de expressão em bactérias é o potencial para fazer muitas modificações pós-traducionais tipicamente associadas a eucariotos superiores, como processamento de sequências sinais, conformação,

formação de pontes dissulfeto, certos tipos de adição de lipídios, e glicosilações, modificações necessárias para atividade biológica das proteínas (Macauley-Patrick *et al.*, 2005).

Proteínas heterólogas expressas em *P. pastoris* podem ser produzidas em grandes quantidades tanto intracelularmente como secretadas ao meio de cultura. Devido ao fato desta levedura secretar poucas proteínas nativas, a purificação de proteínas heterólogas no sobrenadante da cultura é facilitada. Outras características vantajosas de *P. pastoris* como sistema de expressão heterólogas são o fato desta levedura ter o status GRAS (*Generally Regarded As Safe*) e ter a habilidade de glicosilar proteínas de forma mais próxima aos mamíferos (em média 8-14 resíduos de manose) (Liu *et al.*, 2004b), ao contrario de *S. cerevisiae* que pode hiperglicosilar as proteínas heterólogas adicionando mais de 40 resíduos de manose (Cereghino & Cregg, 2000).

Outra vantagem é que as técnicas requeridas para manipulação molecular de *P. pastoris* são similares às descritas para *S. cerevisiae*. A forma preferencial de transformação em *P. pastoris* é via integração cromossomal por recombinação homóloga. Há várias vantagens em utilizar a transformação integrativa, dentre elas, a estabilidade do cassete de expressão, a obtenção de transformantes com múltiplas cópias e o controle do sitio de integração (Sreekrishna *et al.*, 1997).

Alem disso, os vetores de expressão gênica para uso com a levedura *P. pastoris* estão bem estabelecidos com suas sequências promotora, de término da transcrição, de integração no genoma e secreção bem caracterizadas (Daly & Hearn, 2004). Os vetores também apresentam marcas de seleção. As marcas existentes são limitadas aos genes da via biossintética *HIS4* de *P. pastoris* e *S.*

cerevisiae, e *ARG4* de *S. cerevisiae*, e o gene *Sh ble* do *Streptoalloteichus hindustanus* o qual confere resistência à droga Zeocina[®], relacionada à bleomicina (Higgins *et al.*, 1998).

3. Objetivos

3.1 Geral

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de estratégias vacinais para o controle das doenças associadas ao papilomavírus bovino baseada em vacina de subunidade e imunização genética.

3.2 Específicos

1 Expressar os genes L1 dos BPVs 1, 2 e 4 em levedura *Pichia pastoris* sob o controle do promotor induzível por metanol *AOX1*;

2 Expressar o gene L1 de BPV-1 códon-otimizado em levedura *P. pastoris* sob o controle do promotor induzível por metanol *AOX1* e do promotor constitutivo *PGK1*;

3 Produzir as proteínas L2 e E5 de BPV-1 em células de mamíferos transfectadas com vetor plasmidial contendo os genes L2 e E5.

4. Capítulo I

Artigo científico publicado na revista Genetics and Molecular Research

Expression of the bovine papillomavirus type 1, 2 and 4 L1 genes in the yeast
Pichia pastoris

A.L.S. Jesus¹, F.C. Mariz¹, H.M. Souza¹, M.N. Cordeiro¹, E.C. Coimbra¹, M.C.G. Leitão¹, L.M. Nascimento², R.C. Stocco³, W. Beçak^{3,4} and A.C. Freitas¹.

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brasil.

³Laboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Universidade da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, PR, Brasil.

Expression of the bovine papillomavirus type 1, 2 and 4 L1 genes in the yeast *Pichia pastoris*

A.L.S. Jesus¹, F.C. Mariz¹, H.M. Souza¹, M.N. Cordeiro¹, E.C. Coimbra¹, M.C.G. Leitão¹, L.M. Nascimento², R.C. Stocco³, W. Beçak^{3,4} and A.C. Freitas¹

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brasil

³Laboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

⁴Departamento de Ciências Biológicas, Universidade da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, PR, Brasil

Corresponding author: A.C. Freitas

E-mail: antonio.freitas@pq.cnpq.br

Genet. Mol. Res. 11 (3): 2598-2607 (2012)

Received November 24, 2011

Accepted March 12, 2012

Published July 19, 2012

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2012.July.19.2>

ABSTRACT. Papillomaviruses are known to cause benign or malignant lesions in various animals. In cattle, bovine papillomavirus (BPV) is the etiologic agent of papillomatosis and neoplasia of the upper gastrointestinal tract and urinary bladder. Currently, there are no standard diagnostic tests or prophylactic vaccines. Protection against papillomavirus infection is conferred by neutralizing antibodies directed towards the major structural protein L1. These antibodies can be efficiently induced by immunization with virus-like particles that are formed spontaneously after L1 gene expression in recombinant systems. The yeast *Pichia pastoris* is known to provide an efficient system for expression of proteins due to reduced cost and high levels of protein production. We evaluated *P. pastoris* for expression of the L1 gene from BPV1, BPV2 and BPV4. After methanol induction, the recombinants were able to produce L1 proteins of the three different BPV types. To increase heterologous L1 protein levels, a codon optimization strategy was used for production under bioreactor conditions. The BPV1 L1

protein was identified by monoclonal antibody anti-6xHis. This is the first report of BPV L1 expression in yeast.

Key words: Bovine papillomavirus; *Pichia pastoris*; L1 gene

INTRODUCTION

Papillomaviruses are a heterogeneous group of viruses associated with specific epithelial lesions. They are small, double-stranded DNA viruses related to a wide variety of proliferative lesions of epithelial origin that are associated with different oncogenic processes in humans and other vertebrates (zur Hausen, 2002). Papillomavirus infection begins in basal cells that are accessed through microabrasions resulting from various forms of physical trauma (Campo, 2002).

In cattle, bovine papillomavirus (BPV) is the etiologic agent of cutaneous papillomatosis and neoplasia of the upper gastrointestinal tract and urinary bladder. BPV has been studied as an infectious agent, as an animal model to investigate the relationship between papillomavirus and its natural hosts, and as a model for human papillomavirus vaccination studies (Campo, 2006). Eleven BPV types have been characterized associated with specific lesions with various histopathological characteristics. The bovine papillomatosis is an important disease leading to economic depreciation of animals and the deterioration of the appearance of the animal and animal leather. The lesions may progress to cancer due to the synergistic action of genetic or environmental co-factors (Leal et al., 2003; Borzacchiello and Roperto, 2008). Although papillomaviruses are considered strictly species specific, BPV1 and, less frequently, BPV2 are recognized as the most important etiological agents in the development of fibroblastic skin tumors, or equine sarcoids, which affect horses, donkeys, and mules (Chambers et al., 2003; Bogaert et al., 2008; Nasir and Campo, 2008).

The main strategies to develop vaccines directed to papillomaviruses are related to the virus capsid proteins L1 and L2. The L1 protein comprises 90% of the capsid structure and is organized in pentamers associated with L2 protein (Campo, 2006). When expressed in eukaryotic and some prokaryotic systems, L1 can self-assemble into a structure similar to that of the viral capsid. These virus-like particles (VLPs) (Kirnbauer et al., 1992; Campo, 2006) are morphologically indistinguishable from native virions and preserve the necessary conformational epitopes to induce high titers of neutralizing antibodies (Dupuy et al., 1999; Palker et al., 2001). Because the VLPs do not contain the viral genome, they are not infectious or oncogenic and thus represent an excellent target for the development of prophylactic vaccines against papillomavirus. The expression of papillomavirus capsid protein has been reported in several heterologous expression systems such as bacteria, yeast, baculovirus-infected insect cells, transgenic plants, and mammalian cells (Liu et al., 2005; Aires et al., 2006; Park et al., 2008). BPV VLPs produced in insect cells have been described as providing potent prophylactic vaccines against BPV4 infection (Kirnbauer et al., 1996).

During the last several decades, a *Pichia pastoris* expression system has been used successfully to produce various recombinant proteins. This system offers many advantages, such as tight regulation of the promoter of the alcohol oxidase 1 gene (*AOX1*) by methanol, easy growth at high cell densities, high levels of protein production at the intra- or extracellular level, and the opportunity to perform posttranslational modifications typically associated

with higher eukaryotes (Macauley-Patrick et al., 2005). The aim of this work was to evaluate a *P. pastoris* expression system for BPV1, BPV2, and BPV4 L1 gene expression and consequent protein production.

MATERIAL AND METHODS

Construction of expression vectors

Escherichia coli TOP10 (Invitrogen, São Paulo, Brazil) was used as a host strain for plasmid cloning experiments. For expression in *P. pastoris*, the wild-type X-33 strain (Mut⁺, His⁺) and pPICZA expression vector were purchased from Invitrogen as part of an EasySelect[®] *Pichia* Expression kit. DNA manipulations were performed according to standard protocols recommended by Sambrook et al. (1989).

The L1 genes were amplified with polymerase chain reaction (PCR) from the complete viral genomes of BPVs 1, 2, and 4 with Platinum *Taq* DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen). Specific primers were designed based on complete BPV sequences deposited in GenBank. The forward primers contained the yeast Kozak consensus sequence and a restriction site for *Eco*RI in the 5' end. The reverse primers had a restriction site for *Xho*I in the 5' end. The amplified L1 fragments were initially cloned into a pGEM-T Easy vector (Promega, Wisconsin, USA). After digestion with *Eco*RI and *Xho*I enzymes (New England Biolabs, Massachusetts, USA), the inserts were cloned in frame into the pPICZA expression vector. Then, *E. coli* TOP10 were transformed and plated onto low-salt Luria-Bertani medium (0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1% tryptone, pH 7.5) supplemented with 25 µg/mL Zeocin[®] (Invitrogen). The presence and orientation of the insert were analyzed with PCR, enzyme digestion, and sequencing (ABI3100 sequencer, Applied Biosystems). The L1 proteins were expressed fused to a 6xHis tag at the C-terminus in the pPICZA vector.

In addition, the BPV1 L1 gene was synthesized with codons optimized for expression in *P. pastoris* yeast. Codon usage analyses of the heterologous gene and the host organism were performed using the online program Graphical Codon Usage Analyzer (<http://gcua.schoedl.de>). We also analyzed the GC content of the heterologous gene using Generunner for Windows version 3.05 (Hasting Software). The codon-optimized L1 gene was cloned into the pPICZA expression vector, and the presence of the insert was confirmed with PCR, enzyme digestion, and sequencing.

Transformation of *P. pastoris* and selection of recombinants

P. pastoris X-33 was transformed through electroporation with the expression plasmids previously linearized with the *Sac*I enzyme (New England Biolabs) using a Multiporator system (Eppendorf, Hamburg, Germany). The X-33 strain transformed with the empty pPICZA plasmid was used as a negative control. Immediately after the pulse, cold 1 M sorbitol was added and the cells were incubated for 2 h at 30°C. The transformants were selected on plates with YPDS medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1 M sorbitol) containing 100 µg/mL Zeocin[®] and incubated for 2-3 days at 30°C. The presence of the integrated expression plasmids in the transformants was confirmed using colony PCR according to manufacturer recommendations with primers complementary to the 5' and 3' region of *AOX1*.

Expression of L1 genes in *P. pastoris* in shake flasks

The positive recombinants for colony PCR were grown in minimal glycerol medium (MGY; 1% glycerol, 1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% yeast nitrogen base, 0.002% biotin) in baffled flasks at 28°C for 24 h under agitation. For induction of L1 gene expression, the cells were centrifuged, transferred to minimal methanol medium (the same components as those of MGY with glycerol replaced by methanol 0.5%), and the culture was kept at 28°C under vigorous agitation for 96 h. To maintain the induction of recombinant protein, methanol was added to the culture every 24 h to a final concentration of 2%.

Expression of L1 genes in *P. pastoris* in a bioreactor

Cultivations were performed in a 1.3-L bioreactor (BioFlo 110, New Brunswick Scientific, USA) at 28°C and an agitation of 350 rpm. Pre-cultures were inoculated into in 50 mL MGY medium in shake flasks. The cells were grown to an optical density at 600 nm of 3 before adding the inoculum of 50 mL to the bioreactor to reach a working volume of 500 mL MGY medium. After 24 h of biomass generation and total consumption of glycerol in the medium, methanol was added every 24 h to a final concentration of 1% (v/v) to induce protein expression for 48 h. The glycerol and methanol feed batches during bioreactor cultivation were carried out according to the *Pichia* fermentation protocol (Invitrogen). Aeration was kept constant at 1.0 vvm, and pure oxygen was supplied as needed. The medium pH was adjusted and controlled at 6.0 with the addition of 28% (v/v) ammonium hydroxide. Foam formation was suppressed by the addition of antifoam reagent (Antifoam C; Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil).

P. pastoris cell lysis

Yeast cells were harvested by centrifugation, washed, and resuspended in breaking buffer (50 mM sodium phosphate, pH 7.4, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5% glycerol). An equal volume of 0.5-mm acid-washed glass beads (Sigma-Aldrich) was added to the tubes, and a total of 10 cycles of vortexing and incubation on ice for 30 s each were performed. The samples were centrifuged, and the supernatant was transferred to a new tube.

Protein purification

After induction with methanol, the yeast cells were recovered, and the protein extract was obtained. The purification of the recombinant protein was performed on a nickel column with a ProBond® Purification System kit (Invitrogen) following manufacturer recommendations.

RT-PCR

Yeast cells were recovered, and total RNA was extracted from the samples using an SV Total RNA Isolation System kit (Promega) following manufacturer recommendations. The L1 messenger RNA (mRNA) was detected using RT-PCR with an Improm-II Reverse Transcription System (Promega). The amplification was performed with specific primers that amplify a 500-bp internal fragment from BPV1, 2, and 4 L1 genes.

Dot blot assay

For dot blot analysis, protein adsorption was carried out by spotting approximately 10 μ L protein extract on a nitrocellulose membrane. The membrane was dried and then blocked with 2.5% nonfat dry milk and incubated with antibody anti-6xHis alkaline phosphatase conjugated (Sigma-Aldrich) at a dilution of 1:20,000. After 3 washes with PBS 0.05% Tween 20, the membranes were revealed with nitro-blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate (NTB/BCIP[®]) substrate (Sigma-Aldrich).

SDS-PAGE and Western blot assay

The proteins were boiled in SDS-loading buffer (10% 2-mercaptoethanol, 4% SDS, 0.004% bromophenol blue, 20% glycerol, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8) for 10 min and separated using 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The gel was stained with Coomassie brilliant blue. For the Western blot, proteins were transferred onto PVDF membranes (Millipore, São Paulo, Brazil). The membranes were blocked in 5% nonfat dry milk for 1 h and incubated overnight at 4°C with antibody anti-6xHis alkaline phosphatase conjugated at a dilution of 1:1000. The membranes were then washed 3 times with PBS 0.05% Tween 20 for 10 min. The L1 protein detection was performed using the VISIGLO[®] chemiluminescent substrate (Amresco, Ohio, USA).

RESULTS

Expression of BPV1, 2, and 4 L1 genes in *P. pastoris*

BPV1, 2, and 4 L1 genes were cloned into the pPICZA expression vector under the control of an inducible *AOX1* promoter. *P. pastoris* transformed with these constructs were grown in medium with methanol and analyzed for L1 gene expression and protein production. After 72 h of methanol induction, recombinant *P. pastoris* were analyzed for BPV1, 2, and 4 L1 gene expression using RT-PCR. A 500-bp fragment of the L1 gene was detected (Figure 1), indicating L1 transcription. As a genomic DNA contamination control, a reverse transcription reaction without reverse transcriptase enzyme was performed for the samples analyzed (see Figure 1).

For analysis of L1 protein production in recombinant *P. pastoris*, the protein extract was analyzed using SDS-PAGE. Although the protein profile showed no signal of degradation, the band related to the L1 protein (~55 kDa) could not be visualized (Figure 2). The production of L1 protein was confirmed by dot blot assay using anti-6xHis antibody in the protein extract of the same recombinants positive for BPV1, 2, and 4 L1 gene transcription (Figure 3). The L1 protein was detected in protein extracts of the clones in the amounts of protein tested (0.3, 0.6, and 1.2 μ g). The X-33/pPICZL1B4 clone displayed a weak signal at the levels evaluated; however, a new dot blot using larger amounts of protein extract (1.7, 3.4, and 6.8 μ g) demonstrated better results, confirming the production of BPV4 L1 protein in the protein extract of *P. pastoris* clones (see Figure 3). Several Western blot assays using anti-6xHis antibody were then performed, with no satisfactory results.

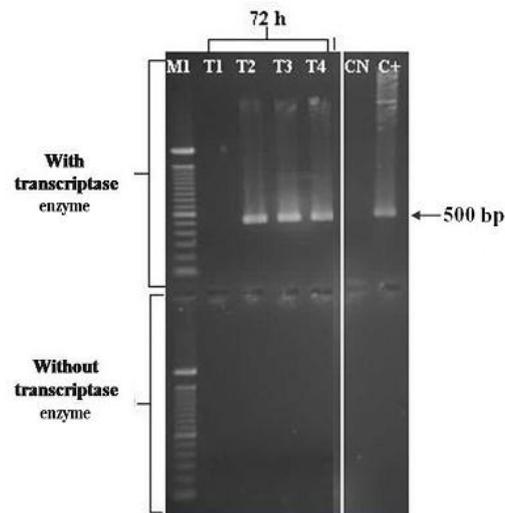


Figure 1. RT-PCR of recombinant *Pichia pastoris* after 72 h of methanol induction. The mRNAs of BPV 1, 2 and 4 L1 genes were detected using specific primers that amplify a 500-bp fragment on the central portion of the nucleotide sequence, encoding L1 protein. Lane M1 = 100-bp DNA ladder (Promega); lane T1 = X33/pPICZA clone (empty vector, negative control of L1 expression); lanes T2, T3 and T4 = X33/pPICZAL1B1, X33/pPICZAL1B2 and X33/pPICZAL1B4 clones, respectively; lane CN = control reaction (without DNA); lane C+ = plasmid used as positive control reaction. The upper side corresponds to the RT-PCR experimental test. The lower side corresponds to the control experiment of genomic DNA contamination, in which the reverse transcription reaction was performed without the reverse transcriptase enzyme.

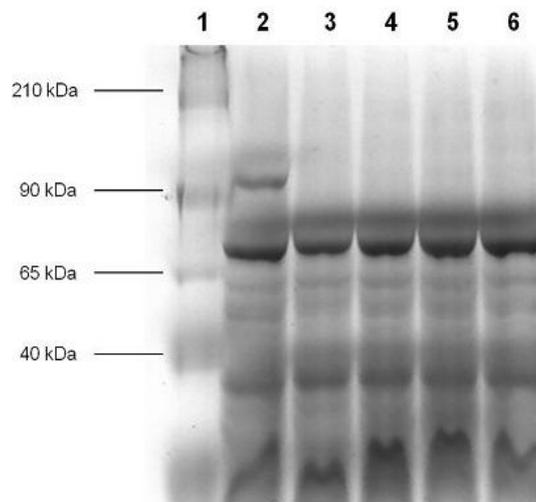


Figure 2. SDS-PAGE of recombinant *Pichia pastoris* after 72 h of methanol induction. The yeast cells were lysed after cultivation in medium with methanol and the soluble protein extract was fractionated on 12.5% SDS-PAGE (around 40 µg/lane). Lane 1 = Color Burst Electrophoresis Marker (Sigma); lane 2 = protein extract of recombinant *P. pastoris* GS115/pPICZLacZ, positive control of intracellular expression in *P. pastoris* provided by the EasySelect® *Pichia* Expression Kit (Invitrogen); lanes 3, 4 and 5 = protein extract of recombinant *P. pastoris* X33/pPICZL1B1, X33/pPICZL1B2 and X33/pPICZL1B4, respectively; lane 6 = protein extract of recombinant *P. pastoris* X33/pPICZA, empty vector, negative control of L1 expression. The figure shows that protein degradation did not occur, but the L1 protein band (~55 kDa) could not be verified. Instead, it was possible to detect the band corresponding to β-galactosidase protein (119 kDa). The gel was stained with Coomassie brilliant blue.

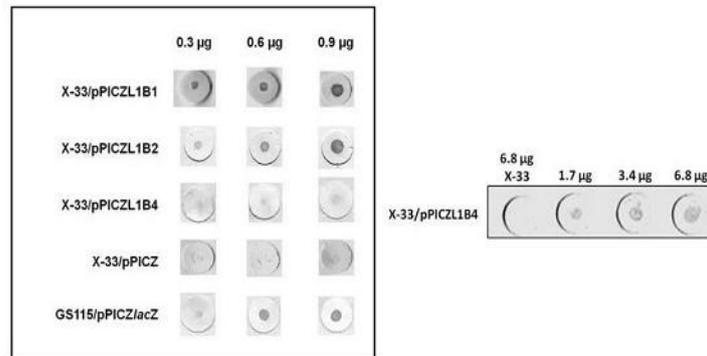


Figure 3. Detection of BPV1, 2 and 4 L1 proteins in recombinant *Pichia pastoris* after 72 h of methanol induction. Dot blots using antibody anti-6xHis alkaline phosphatase conjugated were performed to verify the L1 protein production, which has a C-terminal 6-histidine tag. The assay detected BPV1, 2 and 4 L1 proteins in recombinant *P. pastoris* in the three amounts of proteins tested (0.3, 0.6 and 1.2 µg), while in the X-33/pPICZ clone it was not detected. Although the reaction from the X-33/pPICZL1B4 clone protein extract presented low intensity, the BPV4 L1 protein was observed with greater intensity when tested with larger amounts of protein extract (1.7, 3.4 and 6.8 µg). The assay also was positive in protein extract from *P. pastoris* GS115/pPICZlacZ, provided by the EasySelect® *Pichia* Expression Kit (Invitrogen), which produces β-galactosidase protein fused to 6xHis tag. The samples were diluted and were applied to nitrocellulose membrane. The dot blot was revealed with NBT/BCIP.

Expression of BPV1 L1 gene codon-optimized for *P. pastoris*

After analysis of L1 gene expression in 3 types of BPV, the BPV1 L1 gene was selected for nucleotide sequence modification based on *P. pastoris* preferred codons to increase the expression levels of L1 protein. The codon-optimized gene cloned into the pPICZA vector was successfully expressed after cultivation in a bioreactor. Gene transcription was verified using RT-PCR (data not shown) and protein production by Western blot, which detected a 56-kDa band corresponding to the L1 protein (Figure 4). Higher-molecular-weight proteins were also observed. These bands may be of L1 protein dimers.

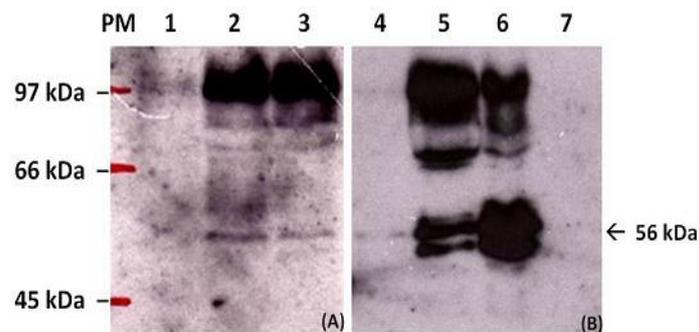


Figure 4. Detection of the recombinant BPV1 L1 protein (56 kDa) in *Pichia pastoris* by Western blot. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membrane for Western blot assay using antibody anti-6xHis alkaline phosphatase conjugated. **A.** Protein extract was obtained at 0, 24, and 48 h after methanol induction. Lane PM = Protein molecular marker LMW (GE Healthcare); lane 1 = expression of the recombinant L1 protein at 0 h; lane 2 = expression of the recombinant L1 protein at 24 h; lane 3 = expression of the recombinant L1 protein at 48 h. **B.** BPV1 L1 protein was purified from protein extract obtained after 48 h of methanol induction using the ProBond® Purification System. Lane 4 = First elution of the purified recombinant L1 protein; lane 5 = second elution; lane 6 = third elution; lane 7 = fourth elution.

DISCUSSION

BPV is distributed worldwide in cattle herds and is recognized as the etiologic agent associated with various benign and malignant tumors and major economic losses. Currently, no vaccine or effective treatment exists to control these infections. Traditionally, prophylactic vaccines for animal viruses are produced with live attenuated or inactivated viruses. Papillomaviruses cannot be cultured *in vitro* for the production of virions or viral proteins, which would be a source of antigens. The developing papillomavirus vaccines are related to the technology of genetic engineering. This report is the first of heterologous expression of BPV genes in yeast. In this work, BPV1, 2, and 4 L1 genes were expressed in *P. pastoris* under control of the methanol-inducible *AOX1* promoter. After optimization of the BPV1 L1 gene and cultivation of recombinant *P. pastoris* in a bioreactor, we detected the 56-kDa L1 protein with Western blot.

The methylotrophic yeast *P. pastoris* has become a highly successful system for the production of a variety of heterologous proteins (Daly and Hearn, 2005; Dummer et al., 2009; Yu et al., 2009); however, many proteins have been produced with varying degrees of success for reasons that remain unclear. Some reports have shown that AT-rich regions of heterologous genes can interrupt transcription, which considerably reduces protein production (Romanos, 1995; Boettner et al., 2007). In *Saccharomyces*, a premature termination of transcription in TA-rich sequences such as TTTTATA, which resembles a sequence in human immunodeficiency virus 1 gp 120, has been verified to cause premature mRNA termination when expressed in *Pichia* (Scorer et al., 1993). In this study, we used RT-PCR to check the transcription of BPV1, 2 and 4 L1 genes from recombinant *P. pastoris*, confirming that the clones were positive for L1 mRNA transcription.

SDS-PAGE was carried out with various protein concentrations to assess whether degradation of protein extract occurred, and although the protein profile indicated that degradation did not occur, the band related to the L1 protein (55-58 kDa) was not visualized. To detect the presence of heterologous protein in the intracellular extract of recombinant yeasts, we initially performed a dot blot assay using an anti-His antibody to identify the 6xHis tag fused to L1 protein. Western blots were performed with positive samples for RT-PCR and dot blot using anti-His antibody, but the heterologous protein signal was not seen, which could be related to low levels of heterologous gene expression.

Enhancing expression levels in *P. pastoris* has required optimization of the heterologous gene through an increase in GC content and the replacement of rare codons with more frequent ones (Bazan et al., 2009; Kotzé et al., 2011). Eukaryotic genes are GC rich and thus more efficiently translated than are viral genes, which are generally rich in AT (Haas et al., 1996). Sinclair and Choy (2002) have shown that heterologous production can have limited success despite high levels of transcription. Thus, the authors compared a codon-optimized construct to a construct with altered GC content and, surprisingly, found that the latter provided higher translation efficiency in *P. pastoris*. Zhou et al. (1999) have observed that the BPV1 L1 gene contains rare translational codons. They therefore replaced the rare codons with codons more commonly used and compared the expression levels of a wild-type and a codon-modified BPV1 L1 gene in transient transfection experiments. Both produced high levels of L1 mRNA in the cytoplasm of cells, but only the codon-modified gene produced detectable levels of L1 protein. In the present study, data obtained from the analysis of BPV1, 2, and

4 L1 sequences revealed a difference of 10-13% between the codon usage of the L1 gene and those of the *P. pastoris* yeast. It is convenient, then, to emphasize that low levels of expression may be associated with the presence of rare codons in relation to the expression host. After codon optimization of BPV1 L1 gene, the codon usage frequency between the wild-type and the codon-optimized gene was reduced from 13 to 8.5%. This small reduction seems to be relevant to the success of heterologous expression in *P. pastoris*.

The levels of L1 protein expression detected in our results may even be related to the conditions adopted in the bioreactor for yeast cultivation or in the induction of the *AOX1* promoter. Although the expression of heterologous proteins in *P. pastoris* can be successfully performed in flasks, production levels are higher when bioreactors are used because parameters such as pH, aeration, and feeding rates of carbon sources can be controlled (Macauley-Patrick et al., 2005; Kotzé et al., 2011). In addition, the metabolism of methanol requires high levels of oxygen; thus, the expression of genes regulated by the *AOX1* promoter is negatively affected by oxygen limitation (Cereghino et al., 2002). Kotzé et al. (2011) have reported a failure to detect the HPV16 L1 gene intracellularly in *P. pastoris* using flasks. Significant levels of expression were detected only when the gene was expressed in a bioreactor. Conversely, Bazan et al. (2009) have expressed a codon-optimized HPV16 L1 gene in *P. pastoris* using flasks; however, they applied a strategy using a non-integrative plasmid expression system. Unlike integrative systems, episomal plasmids have some important disadvantages such as clonal instability, which requires continuous antibiotic selection.

In the Western blotting, we visualized some bands higher than 56 kDa, the expected molecular weight for the L1 protein. These bands probably correspond to dimers of L1 (Kirnbauer et al., 1996; Modis et al., 2002). Interestingly, we observed that after the recombinant protein was purified, we could recover a larger amount of the L1 monomer, possibly owing to the treatment with denaturing buffer from the purification kit.

The present study shows the viability of the *P. pastoris* system for the production of BPV L1 protein, a natural candidate for the development of vaccination strategies against BPV infection. In addition, the technology of BPV VLP production may be useful in the development of diagnostic strategies and vehicles with which to deliver epitopes or genes as well as for the design of interaction studies between papillomaviruses and their hosts.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). We thank Dr. Marcos Antonio Morais Jr. and his staff at the Laboratory of Metabolic Engineering, Federal University of Pernambuco, Brazil, for technical support in experiments with bioreactor, and Dr. Oswaldo Pompilio de Melo Neto and his staff at the Laboratory of Microbiology, Aggeu Magalhães Research Center, Pernambuco, Brazil, for help with immunoblotting experiments.

REFERENCES

- Aires KA, Cianciarullo AM, Carneiro SM, Villa LL, et al. (2006). Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 745-752.
- Bazan SB, de Alencar Muniz CA, Aires KA, Cianciarullo AM, et al. (2009). Expression and characterization of HPV-16

- L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Arch. Virol.* 154: 1609-1617.
- Boettner M, Steffens C, von Mering C, Bork P, et al. (2007). Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*-A comparative view on 79 human genes. *J. Biotechnol.* 130: 1-10.
- Bogaert L, Martens A, Van Poucke M, Ducatelle R, et al. (2008). High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin of equine sarcoid-affected and healthy horses. *Vet. Microbiol.* 129: 58-68.
- Borzacchiello G and Roperto F (2008). Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet. Res.* 39: 45.
- Campo MS (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res.* 89: 249-261.
- Campo MS (2006). Bovine papillomavirus: Old System, New Lessons? In: Papillomavirus Biology: From Natural History to Vaccine and Beyond (Campo MS, ed.). Caister Academic Press, Wymondham.
- Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C and Cregg JM (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 329-332.
- Chambers G, Ellsmore VA, O'Brien PM, Reid SW, et al. (2003). Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *J. Gen. Virol.* 84: 1055-1062.
- Daly R and Hearn MT (2005). Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J. Mol. Recognit.* 18: 119-138.
- Dummer LA, Conceicao FR, Nizoli LQ, de Moraes CM, et al. (2009). Cloning and expression of a truncated form of envelope glycoprotein D of Bovine herpesvirus type 5 in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Virol. Methods* 161: 84-90.
- Dupuy C, Buzoni-Gatel D, Touze A, Bout D, et al. (1999). Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes. *J. Virol.* 73: 9063-9071.
- Haas J, Park EC and Seed B (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr. Biol.* 6: 315-324.
- Kimbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, et al. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 12180-12184.
- Kimbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, Wagner ER, et al. (1996). Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 219: 37-44.
- Kotzé L, Smith JJ, den Haan R and van Zyl WH (2011). Expression of human papillomavirus type 16 (HPV16) L1 protein in *Pichia pastoris*. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 214-219.
- Leal AM, Ferraz OP, Carvalho C, Freitas AC, et al. (2003). Quercetin induces structural chromosomal aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4. *Vet. Comp. Oncol.* 1: 15-21.
- Liu HL, Li WS, Lei T, Zheng J, et al. (2005). Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in transgenic tobacco plants. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 37: 153-158.
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B and Harvey LM (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22: 249-270.
- Modis Y, Trus BL and Harrison SC (2002). Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J.* 21: 4754-4762.
- Nasir L and Campo MS (2008). Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovinds and equids. *Vet. Dermatol.* 19: 243-254.
- Palker TJ, Monteiro JM, Martin MM, Kakareka C, et al. (2001). Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles. *Vaccine* 19: 3733-3743.
- Park MA, Kim HJ and Kim HJ (2008). Optimum conditions for production and purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr. Purif.* 59: 175-181.
- Romanos M (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 527-533.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Scorer CA, Buckholz RG, Clare JJ and Romanos MA (1993). The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136: 111-119.
- Sinclair G and Choy FY (2002). Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 26: 96-105.
- Yu X-W, Wang L-L and Xu Y (2009). *Rhizopus chinensis* lipase: Gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 57: 304-311.
- Zhou J, Liu WJ, Peng SW, Sun XY, et al. (1999). Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *J. Virol.* 73: 4972-4982.
- zur Hausen H (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2: 342-350.

5. Capítulo II

Artigo científico a ser submetido na revista Journal of Biotechnology

Expression of Bovine Papillomavirus L1 capsid gene in *Pichia pastoris* using *PGK1* promoter

A.L.S. Jesus¹, F.C. Mariz¹, M.N. Cordeiro¹, E.C. Coimbra¹, F.A.G. Torres² and A.C. Freitas¹.

¹Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE), Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil.

FULL-LENGTH PAPER

Expression of Bovine Papillomavirus L1 capsid gene in *Pichia pastoris* using *PGK1* promoter

A.L.S. Jesus^a, F.C. Mariz^a, M.N. Cordeiro^a, E.C. Coimbra^a, F.A.G. Torres^b, A.C. Freitas^a.

^aLaboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, PE 50670-901, Brazil.

^bLaboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil.

Corresponding author:

A.C. Freitas

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Departamento de Genética, Recife, PE, Brazil.

Phone number: +55 81 21268569

Email address: antonio.freitas@pq.cnpq.br

Abstract

The bovine papillomavirus (BPV) has been widely characterized by the economic importance in livestock, being associated with cutaneous papillomatosis and tumors in the urinary bladder and in the upper gastrointestinal tract. The protection against BPV infection is conferred by neutralizing antibodies against the major capsid protein L1. The yeast *Pichia pastoris* is an efficient and low cost heterologous expression system for production of high levels of protein, with some advantages over other systems. The *PGK1* promoter originates from the gene of the 3-phosphoglycerate kinase enzyme, which is involved in both the glycolytic and gluconeogenic pathways. Therefore, this promoter has been used in the construction of expression vectors in various yeasts and filamentous fungi. In this work, it was evaluated the secretory expression of BPV1 capsid protein in *P. pastoris* using the recently isolated *PGK1* promoter. After growth in media with glucose, L1 gene transcription was observed by RT-PCR and L1 protein was detected in the supernatant of the culture by dot blot assay. The results showed that *P. pastoris* recombinants were able to express BPV1 L1 gene but they were not efficient to secrete the recombinant protein.

Key words: Bovine papillomavirus; *Pichia pastoris*; *PGK1* promoter.

1. Introduction

Papillomaviruses are a group of small, nonenveloped, circular double-stranded DNA viruses, characterized by inducing the formation of warts or papillomas in a variety of organisms. These lesions are usually benign and may regress naturally or progress to malignant tumors (Campo, 2006). In cattle, bovine papillomavirus (BPV) is the etiologic agent of cutaneous papillomatosis and neoplasia of the upper gastrointestinal tract and urinary bladder (Borzacchiello and Roperto, 2008). BPV-associated diseases are important economically leading to economic depreciation of animals, deterioration of the appearance and of the animal leather (Campo, 2002; Mello and Leite, 2003). Additionally, BPV1 is recognized as the most important etiological agents in the development of fibroblastic skin tumors, or equine sarcoids, which affect horses, donkeys, and mules (Chambers et al., 2003; Nasir and Campo, 2008).

The main strategies to develop vaccines against papillomaviruses are associated with the major capsid protein L1. These antibodies can be efficiently induced by immunization with virus-like particles (VLPs) that are formed spontaneously after the L1 gene expression in recombinant systems (Kirnbauer et al., 1992). *Pichia pastoris* expression system has been widely used for the production of recombinant proteins, offering many advantages over other systems (Macauley-Patrick et al., 2005).

The majority of the proteins produced in *P. pastoris* have used the methanol-inducible alcohol oxidase (*AOXI*) promoter. Although the *AOXI* promoter has been effective for the expression of various recombinant proteins, there are some disadvantages in using this promoter such as: the necessity of two carbon sources, with a switching over from one to the other at a precise time point; constant monitoring of methanol during the fermentation process; and the long time required to achieve peak product production (Vassileva et al., 2001; Macauley-Patrick et al., 2005). An alternative would be the use of constitutive promoters such as the 3-phosphoglycerate kinase (*PGKI*) promoter. This promoter participates of the glycolytic and gluconeogenic pathway. Due to the high levels of expression, *PGKI* promoter has been used in the construction of expression vectors for several yeasts and filamentous fungi (Fournier et al., 1989; Vanhanen et al., 1991; Streatfield et al., 1993; Grange et al., 1996). Unlike the *AOXI* promoter system, biomass generation and recombinant protein production occur simultaneously in medium containing glucose or glycerol.

Recently, *PGKI* gene from *P. pastoris* was isolated and characterized (Almeida et al. 2005). The *PGKI* promoter is available in an integrative based expression vectors. The levels of expression under the control of the *PGKI* promoter have been significantly higher than under *AOXI* promoter and the time of peak product concentration is lower (Almeida et al., 2005).

This study aimed to express BPV1 capsid gene L1 in yeast *P. pastoris* under the control of the recent isolated *PGKI* promoter.

2. Materials and Methods

2.1 Construction of expression vector

All DNA manipulations were performed according to standard protocols as recommended by Sambrook et al. (1989).

BPV1 L1 gene was synthesized with codons optimized for expression in *P. pastoris* yeast. The codon usage analysis of the heterologous gene and the host organism was performed by the online program Graphical Codon Usage Analyzer (<http://gcua.schoedl.de>). The codon-optimized L1 gene was cloned into pPGKΔ3 expression vector. Basically, this vector contains the *PGK1* promoter, the *S. cerevisiae* α-factor secretion signal sequence downstream of the *PGK1* promoter and the selectable marker Zeocin, which selects the transformants in both *E. coli* and *Pichia*. *E. coli* TOP10 were transformed and plated onto low salt LB medium (0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1% Tryptone, pH 7.5) supplemented with 25 μg/mL Zeocin[®] (Invitrogen, Sao Paulo, Brazil). The presence and orientation of the insert were analyzed by PCR, enzyme digestion and sequencing (ABI3100 sequencer, Applied Biosystems). The L1 proteins were expressed fused to a 6xHis tag at the C-terminus.

2.2 Transformation of *P. pastoris* and selection of recombinants

Pichia pastoris X-33 was transformed by electroporation with the expression plasmids previously linearized by enzyme digestion using Multiporator system (Eppendorf, Hamburg, Germany). *P. pastoris* transformed with empty pPGKΔ3 plasmid was used as negative control. Immediately after the pulse, cold 1M sorbitol was added and the cells were incubated for 2 hours at 30°C. The transformants were selected on plates with YPDS medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1M sorbitol) containing 100, 500 and 1000 μg/mL Zeocin and incubated for 2-3 days at 30°C. The presence of the integrated expression plasmids in the transformants was confirmed by colony PCR.

2.3 Expression of L1 gene in *P. pastoris*

P. pastoris recombinants, obtained by selection on Zeocin, were first screened for production of L1 protein by deep well induction assay. Briefly, the recombinants were inoculated in 1 ml of BMD medium (100 mM potassium phosphate pH 6.0, 1.34% YNB, 0.002% biotin, 2% glucose) and incubated at 28°C for 72 hours under vigorous shaking. After this, the cells were collected and centrifuged (15000 rpm for 5') and the supernatants were used to analyze to the production of L1 protein by dot blot assay using anti-6xHis alkaline phosphatase conjugated (Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil).

The transformants selected on the deep well assay were then cultured in baffled flasks. The clones were inoculated in 50 ml of BMDY medium and incubated at 28°C under vigorous shaking. Aliquots of 10 ml were collected after 24, 48, 72 and 96 hours, centrifuged and the supernatant were stored for further analysis.

2.4 RT-PCR

Yeast cells were recovered after 72 hours of growth BMDY medium and total RNA was extracted from the samples using SV Total RNA Isolation System kit (Promega, Sao Paulo, Brazil), following the manufacturer's recommendations. The L1 mRNA was detected by RT-PCR using the Improm-II Reverse Transcription System (Promega). The amplification was performed with specific primers that amplify a 500bp internal fragment from BPV1 L1 gene.

2.5 Dot blot assay

First, the supernatant of the culture was precipitated with 20% trichloroacetic acid (TCA) (Sigma-Aldrich) for 2 hours at 4°C, centrifuged, washed 3 times with 100% acetone (Vetec Quimica Fina, Sao Paulo, Brazil) and resuspended in PBS 1X. Approximately 10 µl of the precipitated supernatant was applied to nitrocellulose membrane. The membrane was allowed to dry and then, blocked with 2.5% non-fat dry milk and incubated with antibody anti-6xHis alkaline phosphatase conjugated (Sigma-Aldrich) at a dilution of 1:20000. After three washes with PBS-Tween, the membranes were revealed with NTB/BCIP substrate (Sigma-Aldrich).

2.6 SDS-PAGE and Western blot assay

The supernatant was precipitated as described above and the proteins were separated on 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis. The gel was stained with Coomassie brilliant blue. For the Western blot, proteins were transferred onto PVDF membranes (Millipore, Sao Paulo, Brazil). The membranes were blocked in 5% non-fat dry milk for 1h and incubated overnight at 4°C with antibody anti-6xHis alkaline phosphatase conjugated at a dilution of 1:1000. Then, the membranes were washed three

times with PBS-Tween for 10 min. The L1 protein detection was performed using the VISIGLO[®] chemiluminescent substrate (Amresco, Ohio, USA).

3. Results

BPV1 L1 gene was codon-optimized for efficient expression in *P. pastoris*. After synthesis, the gene showed 75% identity with the wild-type sequence (1108/1488 nucleotides) and the codon usage frequency between the wild-type and the codon-optimized gene was reduced from 13 to 8.5%. The codon-optimized BPV1 L1 gene was cloned into the non commercial pPGK Δ 3 expression vector under the control of *PGK1* promoter, resulting in the pPGK1L1B1ot construction. *P. pastoris* was transformed with the construction and the recombinant yeasts were selected by Zeocin resistance. To explore the possibility of enhancing the gene expression, it was isolated putative multicopy recombinants by plating the recombinants on increasing concentration of Zeocin. The ability of the clones to grow in high concentrations of Zeocin should correlate with enhanced copy number. The majority of the analyzed clones grew in the three different concentrations of Zeocin. Then, the recombinants were screened for the recombinant protein by deep well induction assay followed by dot blot assay (Figure 1).

Figure 1.

The selected clones were grown in medium with glucose in baffled flasks and analyzed for heterologous gene expression and protein production. After 72 hours of growth, the yeast cells were collected and total RNA was analyzed for BPV1 L1 gene expression by RT-PCR. A 500-bp internal fragment of the L1 mRNA was detected in the recombinants, indicating L1 gene transcription (Figure 2). As a genomic DNA contamination control, a reverse transcription reaction without reverse transcriptase enzyme was performed for the samples analyzed (Figure 2).

Figure 2.

For analysis of protein production, the supernatant was recovered at 24, 48, 72 and 96 hours of growth and precipitated in 20% TCA. The proteins precipitated from the supernatant were quantified by Bradford method. *P. pastoris* transformed with the

pPGK1L1B1ot construction showed higher production of proteins in the supernatant than yeast transformed with the empty vector (Figure 3A). In addition, the production of recombinant L1 protein was verified by western blot, but it was not possible to visualize the band related to the L1 protein (~55 kDa). The production of L1 protein was confirmed by a new dot blot assay (Figure 3B).

Figure 3.

4. Discussion

Bovine papillomavirus is distributed worldwide in cattle herds and is recognized as the etiologic agent associated with various benign and malignant tumors and major economic losses. Currently, no vaccine or effective treatment exists to control these infections. Due to the lack of *in vitro* systems for production of virions or viral proteins, which would be a source of antigens, technology of genetic engineering have become valuable tool in the development of vaccines against papillomavirus (Campo, 2002). In this work, BPV1 L1 gene was expressed in *P. pastoris* under control of the recent characterized *PGK1* promoter.

The expression of BPV capsid gene has already been reported in heterologous expression systems such as baculovirus-infected insect cells (Kirnbauer et al., 1996) and transgenic plants (Love et al., 2012). The production of BPV capsid proteins has also been reported in the yeast *P. pastoris* (Jesus et al., 2012). In this study, the authors reported the expression of BPVs 1, 2 and 4 L1 genes using the methanol-inducible *AOX1* promoter. In the present study, we report for the first time the production of BPV1 L1 protein using the constitutive *PGK1* promoter of *P. pastoris*. Comparing expression profiles between the two promoters, it is possible to note that *PGK1* promoter provides higher levels of expression of the L1 protein within 48 hours of heterologous protein production. These levels are treated by *AOX1* promoter only about 96 hours of production.

In addition, we chose to produce recombinant protein followed by its secretion to the extracellular medium (using the α -factor secretion signal of *S. cerevisiae*). The secretory expression may be advantageous because *P. pastoris* secretes a few native proteins, facilitating the purification process of recombinant products (Cereghino and Cregg, 2000). While *P. pastoris* can excrete other proteins efficiently (Cregg et al., 1993), some works have reported a limitation in the capacity to secrete recombinant proteins.

Vassileva et al. (2001) showed that *Pichia* appears to possess limited capacity to secrete hepatitis B surface antigen particles presumably because most of the antigen was sequestered in the membrane of the yeast. In the present work, it was not possible to detect the recombinant L1 protein in the supernatant by western blot, possibly due to some protein secretion failure or low gene expression.

To support the heterologous gene expression, RT-PCR was performed to verify the presence of transcription of BPV1 L1 gene in the yeast clones. The assay detected L1 mRNA after growth in glucose media. This result excludes the possibility of interruption of heterologous gene transcription or premature mRNA termination, as previously reported in other works in *Pichia* (Scorer et al., 1993; Boettner et al., 2007).

The present study shows the constitutive expression of BPV L1 protein in *P. pastoris* using the *PGK1* promoter, a candidate for the development of vaccination strategies against BPV infection. The *PGK1* promoter can serve as an attractive alternative to the *AOX1* promoter-based expression systems. However, the secretion expression may be not a good option for the production of recombinant protein in *Pichia*. To improve the protein production, an alternative would be the choice of intracellular expression of the recombinant protein in association with, more efficient and reproducible cell extraction methods.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian Agencies CNPq, CAPES and FACEPE for financial support and Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto and his staff at the Laboratory of Microbiology, Aggeu Magalhaes Research Center, Pernambuco, Brazil, for support in the experiments.

References

- Almeida, J.R., Moraes, L.M., Torres, F.A., 2005. Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (*PGK1*) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast* 22, 25-37.
- Boettner, M., Steffens, C., von Mering, C., Bork, P., Stahl, U., Lang, C., 2007. Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*-A comparative view on 79 human genes. *J. Biotechnol.* 130, 1-10.

- Borzacchiello, G., Roperto, F., 2008. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet. Res.* 39, 45.
- Campo, M.S., 2002. Animal models of Papillomavirus Pathogenesis. *Virus Res.* 89, 249-261.
- Campo, M.S., 2006. Bovine papillomavirus: old system, new lessons?, in: Campo, M.S. (Eds.), *Papillomavirus Biology: from Natural History to Vaccine and Beyond*. Caister Academic Press, Wymondham, England.
- Cereghino, J.L., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol.* 24, 45-66.
- Chambers, G., Ellsmore, V.A., O'Brien, P.M., Reid, S.W.J., Love, S., Campo, M.S., Nasir, L., 2003. Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *J. Gen. Virol.* 84, 1055-1062.
- Cregg, J.M., Vedvick, T.S., Raschke, W.C., 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 11, 905-910.
- Fournier, A., Fler, R., Yeh, P., Mayaux, J.F., 1989. The primary structure of the 3-phosphoglycerate kinase *PGK* gene from *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res.* 18, 365.
- Grange, D.C., Petronius, I.S., Van Zyl, W.H., 1996. Expression of a *Trichoderma reesei* xylanase gene (XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1036-1044.
- Jesus, A.L.S., Mariz, F.C., Souza, H.M., Cordeiro, M.N., Coimbra, E.C., Leitão, M.C.G., Nascimento, L.M., Stocco, R.C., Beçak, W., Freitas, A.C., 2012. Expression of the bovine papillomavirus type 1, 2 and 4 L1 genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genet. Mol. Res.* 11, 2598-2607.
- Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1992. Papillomavirus L1 major capsid protein self assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 12180-12184.
- Kirnbauer, R., Chandrachud, L.M., O'Neil, B.W., Wagner, E.R., Grindlay, G.J., Armstrong, A., McGarvie, G.M., Schiller, J.T., Lowy, D.R., Campo, M.S., 1996. Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 219, 37-44.
- Love, A.J., Chapman, S.N., Matic, S., Noris, E., Lomonossoff, G.P., Talianky, M., 2012. In planta production of a candidate vaccine against bovine papillomavirus type 1. *Planta* 236, 1305-1313.

- Macauley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., Harvey, L.M., 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22, 249-270.
- Melo, C.B., Leite, R.C., 2003. Papilomatose Bovina. *Ciênc. Vet. Tróp.* 6, 1-12.
- Nasir, L., Campo, M.S., 2008. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Vet. Dermatol.* 19, 243-254.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor, Laboratory Press, New York.
- Scorer, C.A., Buckholz, R.G., Clare, J.J., Romanos, M.A., 1993. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136, 111-119.
- Streatfield, S.J., Toews, S., Roberts, D.F., 1992. Functional analysis of the expression of the 3-phosphoglycerate kinase *pgk* gene in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* 233, 231-240.
- Vanhanen, S., Saloheimo, A., Ilmén, M., Knowles, J.K.C., Penttilä, M., 1991. Promoter structure and expression of the 3-phosphoglycerate kinase-encoding gene *pgk1* of *Trichoderma reesei*. *Gene* 106, 129-133.
- Vassileva, A., Chugh, D.A., Swaminathan, S., Khanna, N., 2001. Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* 21, 71-80.

Figure Captions

Figure 1. Screening of recombinant *P. pastoris* for production of L1 protein. The clones were grown in glucose media for 72 h in deep well plates. After the supernatant were recovered and applied on nitrocellulose membrane. Each dot in the membrane represents a positive reaction of recombinant L1 protein with antibody anti-6xHis alkaline phosphatase conjugated. The reaction was revealed with NTB/BCIP substrate.

Figure 2. RT-PCR of recombinant *P. pastoris* after 72 h of growth in glucose media. The mRNAs of BPV1 L1 gene was detected using specific primers that amplify a 500 bp fragment on the central portion of the nucleotide sequence. Lane M: 100bp DNA Ladder (Promega); Lanes 1 and 2: *P. pastoris* transformed with pPGK1L1B1ot construction, expressing the heterologous L1 gene; Lane 3: *P. pastoris* transformed with pPGKΔ3 (empty vector, negative control of L1 expression); Lane 4, 5 and 6: respective control experiment of genomic DNA contamination, in which the reverse transcription reaction was performed without the reverse transcriptase enzyme; Lane C+: plasmid used as positive control reaction; Lane CR: control reaction (without DNA).

Figure 3. Production of recombinant BPV1 L1 protein in the supernatant of *P. pastoris*. In (A), the proteins in the supernatant of the recombinants were quantified by Bradford method; both clones transformed with pPGK1L1B1ot construction showed higher production of proteins in the supernatant than yeast transformed with the empty vector. In (B), the proteins in the supernatant of the recombinants were analyzed for production of L1 protein by dot blot assay; both clones were positive for L1 protein production after 72 h (dots A and B) and 96 h (dots C and D) of growth, while the clone transformed with empty vector was negative (dot E).

Figure 1

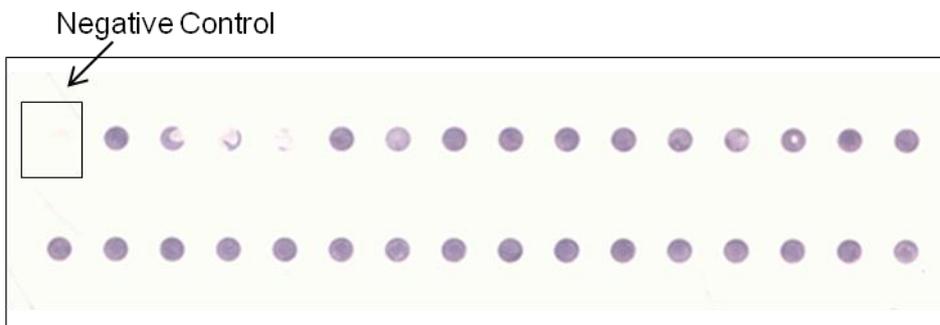


Figure 2

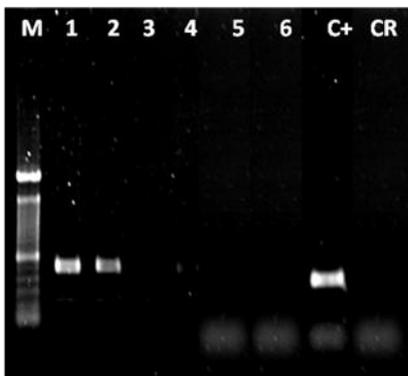
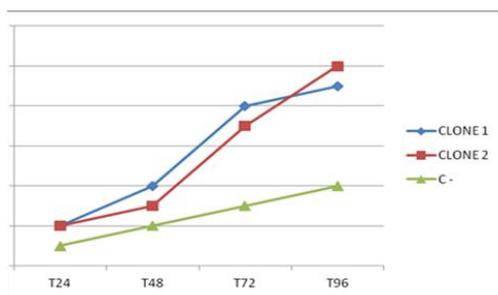
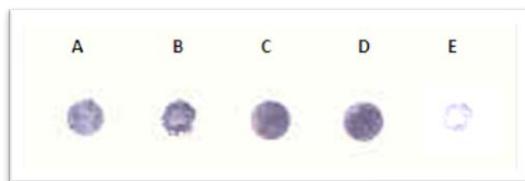


Figure 3



(A)



(B)

6. Capítulo III

Artigo científico aceito para publicação na revista Genetics and Molecular Research

Development of a DNA-based vaccine strategy against bovine papillomavirus infection, involving the E5 or L2 gene

A.L.S. Jesus¹, E.G. Lima¹, R.C. Lira¹, R. Dhalia² and A.C. Freitas¹.

¹Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE), Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brasil.

Short Communication for Genetics and Molecular Research

Title: Development of a DNA-based vaccine strategy against bovine papillomavirus infection, involving the E5 or L2 gene

Running Title: DNA vaccine construction based on BPV E5 and L2 genes

A.L.S. Jesus¹, E.G. Lima¹, R.C. Lira¹, R. Dhalia² and A.C. Freitas¹.

¹ Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE), Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

² Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE), Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brasil

Corresponding author: A.C. Freitas

Phone number: +55 81 21268569

Email: antonio.freitas@pq.cnpq.br; acf_ufpe@yahoo.com.br

ABSTRACT. Papillomaviruses are known to cause tumor lesions, generally benign, in epithelial tissues of diverse organisms; these lesions may progress to cancer under suitable conditions. Bovine papillomavirus (BPV) can cause urinary bladder cancer and cancer of the upper gastrointestinal tract. Furthermore, BPV1 and BPV2 are implicated in the development of tumors in equids. Many studies with animal models clearly demonstrate that DNA vaccines are very effective tools in controlling viral infections, providing strong humoral and cellular immune responses. In this work, we have described the development of two vaccine constructs for the control of diseases caused by BPV. The 1st strategy is prophylactic and is based on the L2 gene; the 2nd is therapeutic and is based on the E5 gene. Vaccine constructs were obtained and evaluated *in vitro* in mammalian cells. The results show the occurrence of E5 and L2 transcription and viral protein production. These results confirm the functionality of the vaccine constructs in mammalian cells. This is the 1st step in the development of a DNA-based vaccine strategy for the control and/or treatment of diseases caused by BPV.

Key words: Bovine papillomavirus; BPV; DNA vaccine.

INTRODUCTION

The cattle industry is one of the mainstays of the Brazilian international agribusiness. However, some diseases are considerably damaging this sector. Among them are diseases caused by papillomavirus, that is, papillomatosis and cancer. Bovine papillomatosis is characterized by the presence of tumors that occur in the skin, mucous membranes, and some organs. It is an important disease leading to economic depreciation of animals and the deterioration of the appearance of the animal and animal leather. Additional economic damage is caused by genital warts, since they lead to loss of reproductive function in both male and female cattle (Campo, 2003). Besides the benign tumors, there is the possibility, under the action of co-factors, of progression to cancer in the upper gastrointestinal tract or urinary bladder, which usually leads to the death of the animal (Campo, 2006). Currently, there are 13 known different types of bovine papillomavirus (BPV), classified according to biological properties and genome

organization (Freitas et al., 2011; Lunardi et al., 2012). Although papillomaviruses are considered strictly species specific, BPV1 and, less frequently, BPV2, are recognized as the most important etiological agents in the development of fibroblastic skin tumors or equine sarcoids, which affect horses, donkeys, and mules (Chambers et al., 2003; Nasir and Campo, 2008). Currently, there is no vaccine or effective treatment for the control of papillomatosis and the related cancers.

Several strategies have been used in the development of different types of vaccine (Kim et al., 2008). DNA vaccines have been considered because they are able to stimulate effective Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) and antibody responses by delivering foreign antigens to Antigen Presenting Cells (APCs) that stimulate CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Naked plasmid DNA vaccines offer a number of advantages when compared to classical vaccines (Gurunathan et al., 2000). They can be produced in a short time, the cost of large-scale production is considerably lower, and the commercial distribution does not require a cold chain because these vaccines are stable at room temperature (Glenting and Wessles, 2005).

E5 protein is the major BPV oncoprotein that acts by disturbing the mechanisms of growth suppression and cell cycle control. Additionally, it interacts with growth factor receptors, activating cellular proliferation (Venuti et al., 2011). L2 protein is the minor viral capsid protein but is essential for papillomavirus infection. It is responsible for binding to a secondary viral receptor, thereby facilitating the exit from the endosome and the delivery of the viral genome to the nucleus (Karanam et al., 2009).

Development of a prophylactic and therapeutic vaccine for BPV infection has become a key issue. This study aimed to construct vaccine vectors based on the BPV1 E5 and L2 genes and to evaluate their potential for expression in mammalian cells.

MATERIAL and METHODS

The BPV1 E5 gene was codon-optimized for expression in mammalian cells and then synthesized by Epoch Biolabs Company (Texas, USA). Besides codon optimization, it was necessary to neutralize the transforming activity of this gene, since we aimed to construct a DNA vaccine for immunization. Therefore, glutamine 17 was replaced by glycine, as this substitution is known to eliminate the biological activity of the E5 protein (Sparkowski et al., 1994). The L2 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the complete BPV1 genome and cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Wisconsin, USA). For both genes, the AU1 epitope was inserted at the N-terminal portion to facilitate immunological detection (Lim et al., 1990). The genes were subcloned into the pCI-neo expression vector (Promega), generating the pCIE5sint and pCIL2 constructs. The presence and orientation of the insert were analyzed by PCR, enzyme digestion, and DNA sequencing.

HEK 293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, Sao Paulo, Brazil), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco, Sao Paulo, Brazil), 1% penicillin/streptomycin (Gibco), and 1% L-glutamine (Sigma, Sao Paulo, Brazil). Cells at approximately 80% confluence were transfected with the pCIE5sint, pCIL2 constructs or the empty pCI-neo vector (negative control) by using Polyfect[®] transfection reagent (Qiagen, Sao Paulo, Brazil), following the manufacturer protocol. After 1 h of incubation, the transfection reagent was removed and complete DMEM was added. Cells were incubated for 48 h at 37°C in 5% CO₂. The expression of viral genes and production of viral proteins were then evaluated as described below.

To evaluate the transcription of the E5 and L2 genes, RT-PCR was performed on the transfected HEK 293 cells. Total RNA was extracted using the RNeasy RNA isolation

kit (Qiagen). The synthesis of cDNA was performed using the ImProm[®]-II Reverse Transcription System (Promega), following the manufacturer recommendations. To eliminate the possibility of genomic DNA contamination of the RNA samples, the material was treated with DNase I (Promega).

Protein expression was evaluated by western blot analysis. Protein extracts of the transfected cells were resuspended in denaturing buffer with protease inhibitor (Roche, Sao Paulo, Brazil) and heated at 95°C for 5 min. The proteins were separated on 12.5 and 15% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes (Millipore, Sao Paulo, Brazil). The membrane was blocked with 5% nonfat dry milk, incubated with anti-AU1 monoclonal antibody (Covance, New Jersey, USA) (1:500) under agitation for 1 h, and washed 3 times with PBS 0.05% Tween 20. The membrane was then incubated for 1 h with anti-mouse IgG HRP conjugated (1:5000) (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA) and washed with PBS-0.05% Tween 20. Protein detection was performed using the ECL chemiluminescent kit (GE Healthcare, Sao Paulo, Brazil).

Because E5 is a membrane protein, it was necessary to perform an immunoprecipitation assay before the western blot analysis. Therefore, the protein extract from cells transfected with the pCIE5sint construct was incubated for 5 min with radioimmunoprecipitation (RIP) buffer and protease inhibitor, homogenized, and centrifuged at 8000 rpm for 5 min. The supernatant then was incubated with anti-AU1 antibody (1:150) for 1 h at 4°C under agitation. A suspension of protein A-Sepharose CL-4B (Invitrogen) was then added and the mixture incubated for 1 h at 4°C with constant rotation. The immunocomplex was washed four times with cold RIP buffer, resuspended in denaturing buffer, and heated for 5 min at 95°C.

RESULTS and DISCUSSION

The production of an effective, safe, low-cost vaccine should lead to a large reduction in the incidence and mortality of animals infected with BPV. This virus is also an excellent model for human papillomavirus vaccination studies. For these reasons, BPV E5 and L2 proteins have been considered strong candidates for DNA vaccines against bovine papillomatosis. In this work, the viral genes were cloned into an expression vector and evaluated for *in vitro* gene transcription and consequent production of viral proteins.

Evaluation of viral gene transcription was performed by RT-PCR in HEK 293 cells transfected with pCIE5sint or pCIL2 constructs. As negative controls, we used cells transfected with empty pCI-neo vector and non-transfected cells. In this assay, we observed amplification of a specific 175-bp fragment related to the E5 gene and a 500-bp internal fragment of the L2 gene (Figure 1). There were no amplified products from samples where the reverse transcriptase enzyme was omitted, indicating there was no contamination with genomic DNA.

Figure 1. RT-PCR detection of the viral genes transcription in the transfected cells using the gene-specific primers. **A.** Analysis of E5 gene transcription showing a fragment of 175 bp. Lane M = 100-bp DNA ladder (Invitrogen); Lane 1 = control reaction (without DNA); Lanes 2, 4 and 6 = respectively, only HEK 293 cells, cells transfected with the empty pCI-neo vector and cells transfected with pCIE5sint; Lanes 3, 5 and 7 = respective control experiment of genomic DNA contamination, in which the reaction was performed without the reverse transcriptase enzyme; Lane 8 = positive control reaction. **B.** Analysis of L2 gene transcription showing the amplification a 500-bp fragment on the central portion of the L2 gene. Lane M = 100-bp DNA ladder (Invitrogen); Lanes 1 and 2 = only HEK 293

cells; Lanes 3 and 4 = cells transfected with the empty pCI-neo vector; Lanes 5 and 6 = cells transfected with pCIL2; Lane 7 = positive control reaction.

Protein extracts of the transfected cells were assessed for the presence of the viral proteins by western blot. The assay detected bands of approximately the expected sizes for BPV1 E5 and L2 proteins (10 and 72 kDa, respectively), only in cells transfected with the pCIE5sint or pCIL2 constructs (Figure 2). It is noteworthy that the E5 protein was detected only after an immunoprecipitation step. This step solubilizes biomembranes, releasing the E5 protein from the cell membranes, resulting in a higher concentration of antigen in the extract (Disbrow et al., 2003).

Figure 2. Western blot detection of E5 and L2 proteins produced in transfected cells. The proteins from only **HEK 293** cells, cells transfected with the empty **pCI-neo** vector and cells transfected with **pCIE5sint** and **pCIL2** were analyzed using antibody anti-AU1. A band of approximately 10 and 72 kDa (expected sizes for BPV1 E5 and L2 proteins) was detected only in the cells transfected with pCIE5sint and pCIL2, respectively. It was used the PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Some studies have already shown the immunogenic potential of the L2 protein against papillomavirus infections, identifying neutralizing and tumor rejection epitopes. However, the main advantage of a vaccine using the L2 gene is the potential to induce a broad spectrum of neutralizing antibodies, possibly with immune cross-reactivity, i.e., L2 can confer immune protection against a range of papillomaviruses, including HPV (Karanam et al., 2009; Jagu et al., 2011). In the case of E5, the possibility of using the gene as a therapeutic vaccine against papillomavirus is still underexplored. The BPV E5 protein is involved in cell transformation; its expression occurs both at the initiation of and during viral infection, modifying the cellular response to growth factors and blocking the expression of the major histocompatibility complex (MHC) on the cell surface, making this gene attractive for use as a DNA vaccine (Borzacchiello and Roperto, 2008; Venuti et al., 2011).

The results presented here show *in vitro* transcription and translation of the E5 and L2 viral proteins, confirming the functionality of the vaccine constructs in mammalian cells. This is the 1st step in the development of a DNA-based vaccine strategy for the control and/or treatment of diseases caused by BPV.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the CNPq, CAPES and FACEPE agencies for financial support and all the staff of Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE) at Aggeu Magalhaes Research Center (FIOCRUZ-PE), Pernambuco, Brazil, for their support in the experiments.

REFERENCES

- Borzacchiello G and Roperto F (2008). Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet. Res.* 39: 45.
- Campo MS (2003). Papillomavirus and disease in humans and animals. *Vet. Comp. Oncol.* 1: 3-14.

- Campo MS (2006). Bovine papillomavirus: old system, new lessons?, In: Papillomavirus Biology: from Natural History to Vaccine and Beyond (Campo, M.S., eds.). Caister Academic Press, Wymondham.
- Chambers G, Ellsmore VA, O'Brien PM, Reid SW, et al. (2003). Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *J. Gen. Virol.* 84: 1055-1062.
- Disbrow GL, Sunitha I, Baker CC, Hanover J, et al. (2003). Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression. *Virology* 311: 105-114.
- Freitas AC, Silva MAR, Jesus ALS, Mariz FC, et al. (2011). Recent insights into Bovine papillomavirus. *Afr. J. Microbiol. Res.* 55: 6004-6012.
- Glenting J and Wessels S (2005). Ensuring safety of DNA vaccines. *Microbial Cell Factories* 4: 1-5.
- Gurunathan S, Klinman DM and Seder RA (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 927-974.
- Jagu S, Malandro N, Kwak K, Yuan H, et al. (2011). A multimeric L2 vaccine for prevention of animal papillomavirus infections. *Virology* 420: 43-50.
- Karanam B, Jagu S, Huh WK and Roden RBS (2009). Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunol and Cell Biol.* 87: 287-299.
- Kim D, Gambhira R, Karanam B, Monie A, et al. (2008). Generation and characterization of a preventive and therapeutic HPV DNA vaccine. *Vaccine* 26: 351-360.
- Lim PS, Jenson AB, Cowsert J, Nakai Y, et al. (1990). Specific interaction of papillomavirus major capsid protein epitopes by immunocytochemistry and epitope scanning of synthetic peptides. *J. Infect. Dis.* 162: 1263-1269.
- Lunardi M, Alfieri AA, Otonel RAA, Alcantara BK, et al. (2012). Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet. Microbiol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.08.030>
- Nasir L and Campo MS (2008). Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Vet. Dermatol.* 19: 243-254.
- Sparkowski J, Anders J and 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.
- Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, et al. (2011). Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Molecular Cancer* 10: 140.

Figure 1

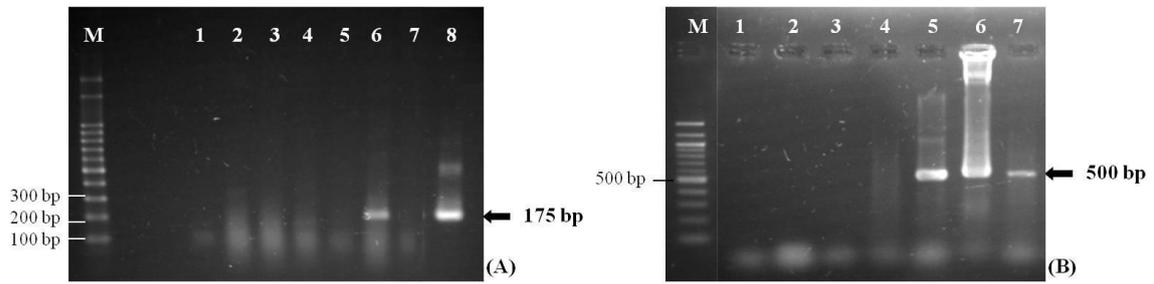
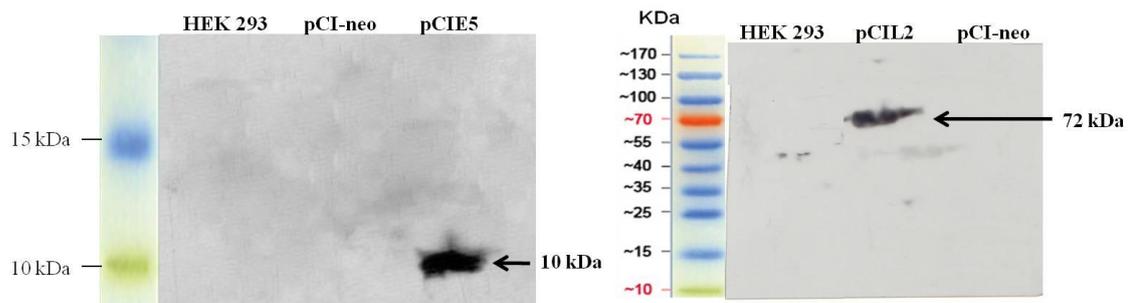


Figure 2



7. Discussão geral

O papilomavírus bovino é distribuído mundialmente em rebanhos bovino e é reconhecido como o agente etiológico, associado a diferentes tumores benignos e malignos, com importantes perdas econômicas para o setor de pecuária leiteira e de corte. Além disso, este vírus está associado ao aparecimento de tumores malignos em equídeos cuja importância é reconhecida pelos criadores de animais de raça. Neste momento, não existe nenhuma vacina ou tratamento eficaz para controlar estas infecções. As vacinas desenvolvidas contra papilomavírus estão relacionadas com a tecnologia de engenharia genética, já que o vírus não pode ser cultivado *in vitro* para a produção de vírions ou proteínas virais (Campo, 2002). Para o papilomavírus humano (HPV) já existem no mercado duas vacinas profiláticas baseada em VLP produzida em levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Gardasil[®], produzida pela Merck & Co.) e em células de inseto infectado por baculovírus (Cervarix[®], produzida pela GlaxoSmithKline).

Nesse trabalho, nós abordamos o tema de estratégias vacinais contra doenças associadas ao papilomavírus bovino por meio da avaliação da expressão da proteína L1 de BPV em sistema baseado na levedura *P. pastoris* e construção e avaliação *in vitro* de vetores vacinais baseados nos genes E5 e L2 de BPV.

O sistema de expressão *P. pastoris* foi usado com a finalidade de produzir as proteínas L1 dos BPVs 1, 2 e 4 como primeiro passo para implementação de uma estratégia vacinal baseada em VLPs. Para aumentar os níveis de produção da proteína recombinante, o gene L1 de BPV-1 foi códon-otimizado para expressão em *P. pastoris*. Alternativamente, para obter maiores níveis de produção e adquirir um produto potencialmente patenteável, o gene L1 códon-

otimizado foi clonado em vetor de expressão não comercial pPGK Δ 3, sob controle do promotor constitutivo *PGK1*.

Estratégias baseadas em VLPs são, conforme demonstrado em humanos, bons candidatos para o desenvolvimento de vacinas profiláticas contra papilomavírus. A expressão de proteínas do capsídeo do papilomavírus humano foi relatada em vários sistemas de expressão heterólogos, tais como bactérias (Nardelli-Haefliger *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001; Aires *et al.*, 2006), leveduras (Sasagawa *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2008), células de insetos infectadas com baculovírus (Kirnbauer *et al.*, 1993) e plantas transgênicas (Liu *et al.*, 2005; Varsani *et al.*, 2006; Kohl *et al.*, 2007). VLPs de BPV produzidas em células de inseto foram descritas como excelentes candidatos vacinais contra infecção por BPV-4 (Kirnbauer *et al.*, 1996).

Alguns autores têm relatado a expressão e purificação da proteína L1 de HPV em *P. pastoris*, caracterizando esse sistema como uma potencial plataforma vacinal devido ao seu baixo custo e aos altos níveis atingidos de produção da proteína recombinante (Liu *et al.*, 2007; Bazan *et al.*, 2009; Kotzé *et al.*, 2011; Coimbra *et al.*, 2011; Hanumantha Rao *et al.*, 2011). Com relação ao BPV, nosso trabalho foi o primeiro relato da produção de proteínas do capsídeo de BPV no sistema *P. pastoris*. Após a otimização do gene L1 de BPV-1 e cultivo dos recombinantes em bioreator, foi possível detectar a proteína L1 de 56 kDa por Western Blot. Adicionalmente, o trabalho aqui apresentado relata pela primeira vez a produção da proteína L1 de BPV-1 secretada no meio extracelular e sob a regulação do promotor constitutivo *PGK1* de *P. pastoris*.

O emprego da via extracelular de expressão pode ser vantajoso porque *P. pastoris* secreta poucas proteínas nativas, facilitando o processo de purificação do

produto recombinante (Cereghino & Cregg, 2000). No entanto, altas densidades celulares deve ser um fator limitante uma vez que a lise das células pode ser aumentada e, conseqüentemente, há liberação de proteases intracelulares no meio, proporcionando proteólise (Zhang *et al.*, 2007b).

O sistema de expressão em *P. pastoris* tem sido utilizado para produção de uma grande número de proteínas heterólogas de diversos organismos (Cregg *et al.*, 2000). Porém, os níveis de produção variam muito dependendo do tipo e das características da proteína a ser produzida. Para aumentar os níveis de expressão em *P. pastoris*, alguns estudos relatam a necessidade de otimizar o gene heterólogo através do aumento do conteúdo GC e substituição de códons raros por códons mais frequentemente utilizados pela levedura (Bazan *et al.*, 2009; Kotzé *et al.*, 2011). No presente trabalho, nós reportamos a existência de uma diferença de 10-13% entre a utilização de códons (*codon usage*) do gene L1 dos BPVs 1, 2 e 4 e da levedura *P. pastoris*. Após a otimização de códons do gene L1 de BPV-1, foi visto que a frequência do *codon usage* entre o gene selvagem e o gene códon-otimizado foi reduzida para 8,5%.

Como mencionado anteriormente, as técnicas de clonagem e expressão gênica são imprescindíveis para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra papilomavíruses, em virtude da impossibilidade da produção em laboratório de uma grande quantidade de vírions (Da Silva *et al.*, 2001). A imunização genética tem sido documentada como uma estratégia efetiva para a indução da imunidade humoral e celular em um grande número de modelos animais. Esta estratégia é capaz de proteger o hospedeiro contra novas infecções virais e regressão das lesões já estabelecidas. A vacina de DNA apresenta várias vantagens atraentes

como a sua simplicidade na produção, estabilidade térmica e segurança biológica (Lin *et al.*, 2006).

Com base nisto, neste trabalho, nos propomos a construir e avaliar *in vitro* dois vetores vacinais baseados nos genes L2 e E5 de BPV de modo a possibilitar o desenvolvimento de estratégias baseada em imunização genética para o controle das doenças causadas pelo BPV-1. O primeiro vetor teria ação profilática, baseada no gene L2 de BPV-1, já o segundo teria ação terapêutica, baseada no gene E5 de BPV-1. Devido a sua característica molecular, o gene E5 foi otimizado para expressão em células de mamífero, já o gene L2 não necessitou ser otimizado. Depois de construídos, os vetores vacinais foram usados para transfectar células de mamífero (HEK 293) e a expressão gênica foi detectada por RT-PCR e a produção das proteínas virais foi confirmada por Western blot.

Alguns estudos já têm mostrado o potencial imunogênico da proteína L2 contra infecções por papilomavírus, identificando epítomos neutralizantes e de rejeição tumoral. Contudo, a principal vantagem de uma vacina usando o gene L2 é conferir indução de um amplo espectro de anticorpos neutralizantes de possível ação cruzada, ou seja, L2 pode conferir proteção imune cruzada a uma gama de papilomavírus (Karanam *et al.*, 2009; Jagu *et al.*, 2010). Segundo Karanam *et al.* (2009), a vacinação em gado com L2 de BPV-2 reduziu o tamanho do inóculo e facilitou a eliminação espontânea dos papilomas. Além disso, há evidências de que animais imunizados com L2 de HPV produziram anticorpos neutralizantes capazes de neutralizar uma gama de genótipos de HPV (Roden *et al.*, 2000; Pastrana *et al.*, 2005). Essas observações contrastam com a proteção fortemente tipo-específica conferida por L1 e sugerem a possibilidade de uma única vacina

profilática pan-HPV, baseada na proteína L2 (Karanam *et al.*, 2009; Jagu *et al.*, 2010). Nossos resultados aqui apresentados indicam a viabilidade da implementação da estratégia para fins vacinais no controle da papilomatose bovina, haja vista que foi possível detectar tanto a presença de transcritos do gene viral como a presença de uma proteína de 72 kDa (tamanho esperado para L2) em cultura de células de mamíferos.

Uma estratégia vacinal dirigida para a prevenção do sarcóide em equinos 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. Para tal objetivo, nós escolhemos uma vacina de DNA usando com alvo terapêutico o gene E5. Embora pouco explorada, a proteína E5 é a principal oncoproteína de BPV e está relacionada à transformação celular. Sua expressão ocorre tanto no início como durante a infecção viral modificando a resposta celular a fatores de crescimento assim como bloqueando a expressão de moléculas do MHC-I na superfície celular, tornando esse gene importante para ser utilizado na vacina de DNA (Venuti *et al.*, 2011). Para incrementar a expressão do gene heterólogo no hospedeiro, o gene E5 foi códon-otimizado para expressão em células de mamífero, pois normalmente o gene E5 de BPV é expresso a níveis muito baixos em células de mamíferos devido à grande incidência de códons raros (cerca de 40%). Além da otimização dos códons, foi feita também a interrupção da ação transformante de E5 para a imunização genética, pois estamos trabalhando como alvo terapêutico uma oncoproteína. Para tal, Sparkowski *et al.* (1994) reportaram que a simples substituição da glutamina localizada no aminoácido 17 por uma glicina é suficiente para extinguir a ação transformante de E5.

O presente estudo, portanto, apresenta resultados promissores para o desenvolvimento de uma plataforma vacinal contra infecções pelo papilomavírus bovino. Logicamente essa plataforma mostra-se ainda num estágio inicial onde ainda se faz necessário alguns passos de otimização do sistema, bem como de maiores e mais refinadas avaliações visando garantir uma maior consolidação da sugerida plataforma.

8. Conclusões gerais

1 Os genes L1 dos BPVs 1, 2 e 4 foram expressos na levedura *P. pastoris* sob o controle do promotor induzível por metanol *AOX1*, porém os níveis de expressão foram baixos, possivelmente devido a diferença no uso de códons entre o vírus e a levedura.

2 Após a otimização dos códons, o gene L1 de BPV-1 foi expresso em altos níveis na levedura *P. pastoris* sob o controle do promotor induzível por metanol *AOX1*. Alternativamente, a proteína L1 de BPV-1 foi produzida em *P. pastoris*, e posteriormente secretada para o meio extracelular, sob o controle do recém-isolado promotor constitutivo *PGK1*. Contudo, possíveis falhas no processo de secreção da proteína recombinante impossibilitaram uma maior produção heteróloga.

3 As proteínas L2 e E5 de BPV-1 foram produzidas em células de mamíferos transfectadas com um vetor plasmidial contendo os genes L2 e E5, respectivamente. Tais vetores poderão agora ser avaliados quanto à capacidade de induzir resposta imune contra o BPV em ensaios *in vivo*.

9. Referências Bibliográficas

- Aires KA, Cianciarullo AM, Carneiro SM, Villa LL, Boccardo E, Pérez-Martinez G, Perez-Arellano I, Oliveira MLS and Ho PL (2006) Production of Human Papillomavirus Type 16 L1 Virus-Like Particles by Recombinant *Lactobacillus casei* Cells. *Appl Environ Microbiol* 72:745-752.
- Almeida JR, Moraes LM and Torres FA (2005) Molecular characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (PGK1) from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Yeast* 22(9):725-37.
- Anderson RA, Scobie L, O'Neil BW, Grindlay GJ and Campo MS (1997) Viral proteins of bovine papillomavirus type 4 during the development of alimentary canal tumours. *Vet J* 154:69-78.
- Araibi EH, Marchetti B, Dornan ES, Ashrafi GH, Dobromylskyj M, Ellis SA and Campo MS (2006) The E5 oncoprotein of BPV-4 does not interfere with the biosynthetic pathway of non-classical MHC class I. *Virology* 353:174-183.
- Araújo JA (2008) Produção de quimosina B de *Bos taurus* em *Pichia pastoris*. Master's thesis, Universidade de Brasília, Brasília.
- Arruda A (2008) Utilização do promotor do gene *PGK1* de *Pichia pastoris* para expressão heteróloga. Master's thesis, Universidade de Brasília, Brasília.
- Ashrafi GH, Pitts JD, Faccini AM, McLean P, O'Brien V, Finbow ME and Campo MS (2000) Binding of bovine papillomavirus type 4 E8 to ductin (16K proteolipid), down-regulation of *gap* junction intercellular communication and full cell transformation are independent events. *J Gen Virol* 81:689-694.
- Bazan SB, Chaves AAM, Aires KA, Cianciarullo AM, Garcea RL and Ho PL (2009) Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Arch Virol* 154:1609-1617.
- Bishop B, Dasgupta J and Chen XS (2007) Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. *Virol J* 4:3.
- Borzacchiello G, Ambrosio V, Roperto S, Poggiali F, Tsirimonakis E, Venuti A, Campo MS and Roperto F (2003) Bovine Papillomavirus Type 4 in Oesophageal Papillomas of Cattle from the South of Italy. *J Comp Path* 128:203-206.
- Borzacchiello G and Roperto F (2008) Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet Res* 39:45.
- Borzacchiello G, Russo V, Gentile F, Roperto F, Venuti A, Nitsch L, Campo MS and Roperto S (2006) Bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the activated form of the platelet derived growth factor [beta] receptor in naturally occurring bovine urinary bladder tumours. *Oncogene* 25:1251-60.
- Breitbart F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trin-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT and Lowy DR (1995) Immunization with virus-like particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol* 69:3959-3963.
- Buch CB, Thompson CD, Pang YS, Lowy DR and Schiller JT (2005) Maturation of Papillomavirus Capsids. *J Virol* 79:2839-2846.
- Burnett S, Jareborg N and DiMaio D (1992) Localization of bovine papillomavirus type 1 E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5665-5669.
- Campo MS (1997) Bovine papillomavirus and cancer. *Vet J* 154:175-188.

- Campo MS (1998) Persistent infection by bovine papillomavirus. In: Ahmed R and Chen ISY (eds) Persistent Viral Infections. Wiley, pp 503-516.
- Campo MS (2002) Animal Models of Papillomavirus Pathogenesis. *Virus Res* 89:249-261.
- Campo MS (2006) Bovine papillomavirus: old system, new lessons? In: Campo MS (ed) Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond. Caister Academic Press, Wymondham.
- Campo MS, Jarrett WFH, Grindlay GJ, Chandrachud LM, McGarvie GM and O'Neil BW (1993) Prophylactic and therapeutic vaccination against a mucosal papillomavirus. *J Gen Virol* 74:945-953.
- Campo MS, O'Neil BW, Grindlay GJ, Curtis F, Knowles G and Chandrachud LM (1997) A peptide encoding a B-cell epitope from the N-terminus of the capsid protein L2 of bovine papillomavirus-4 prevents disease. *Virology* 234:261-266.
- Candido AL, Resende M and Bessa LRG (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 AC, Bruner O, Góes LGB, Yagui-Cavalcanti A, Beçak W and Stocco doas Santos RC (2003) Bovine papillomavirus type 2 in reproductive tract and gametes of slaughtered bovine females. *Braz J Microbiol* 34:82-84.
- Cereghino GL (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol* 13:329-332.
- Cereghino JL and Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol* 24:45-66.
- Chambers G, Ellsmore VA, O'Brien PM, Reid SWJ, Love S, Campo MS and Nasir L (2003) Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *J Gen Virol* 84:1055-62.
- Chandrachud LM, Grindlay GJ, McGarvie GM, O'Neil BW, Wagner ER, Jarrett WF and Campo MS (1995) Vaccination of cattle with the N-terminus of L2 is necessary and sufficient for preventing infection by bovine papillomavirus type 4. *Virology* 211:204-208.
- Chandrachud LM, O'Neil BW, Jarrett WHF, Grindlay GJ, McGarvie GM and Campo MS (1994) Humoral immune response to the E7 protein of bovine papillomavirus type 4 and identification of B-cell epitopes. *Virology* 200:98-104.
- Chen XS, Casini G, Harrison SC and Garcea RL (2001) Papillomavirus capsid protein expression in *Escherichia coli*: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *J Mol Biol* 307:173-182.
- Coimbra EC, Gomes FB, Campos JF, D'arc M, Carvalho JC, Mariz FC, Jesus ALS, Stocco RC, Beçak W and Freitas AC (2011) Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. *Braz J Med Biol Res* 44:1194-1298.
- Confer AW and Panciera RJ (2001) The urinary system. In: Thomson's Special Veterinary Pathology. 3rd edition. Missouri, pp 235-77.
- Corrêa WM and Corrêa CNM (1992) Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos: Papilomatoses. 2nd edition. Medsi, Rio de Janeiro.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J and Higgins DR (2000) Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 16:23-52.

- da Silva DM, Eiben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, Rudolf MP, Velders MP and Kast WM (2001) Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Physiol* 186:169-182.
- Dall MTL, Nicaud JM, Treton BY and Gaillardin CM (1996) The 3-phosphoglycerate kinase gene of the yeast *Yarrowia lipolytica* de-represses on gluconeogenic substrates. *Curr Genetics* 29:446-456.
- Daly R and Hearn MTW (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit* 18:119-138.
- Davis HL and McCluskie MJ (1999) DNA vaccines for viral diseases. *Microbes Infection* 1:7-21.
- Day PM, Lowy DR and Schiller JT (2003) Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* 307:1-11.
- Day PM and Schiller JT (2006) Early events in the papillomaviral life cycle. In: Campo MS (ed) *Papillomavirus research from natural history to vaccines and beyond*. Caister Academic Press, Wymondham, pp 174-192.
- de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U and zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27.
- Demain AL and Adrio JL (2008) Contributions of Microorganisms to Industrial Biology. *Mol Biotechnol* 38:41-55.
- DeMasi J, Chao MC, Kumar AS and Howley PM (2007) Bovine papillomavirus E7 oncoprotein inhibits anoikis. *J Virol* 81:9419-9425.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C and 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.
- Dunham SP (2002) The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Res Vet Sci* 73(1):9-16.
- Dupuy C, Buzoni-Gatel D, Touzé A, Bout D and Coursaget P (1999) Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes. *J Virol* 73(11):9063-71.
- Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K and McMillan NA (1997) Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol* 71:2449-2456.
- Feeney KM, Saade A, Okrasa K and Parish JL (2011) *In vivo* analysis of the cell cycle dependent association of the bovine papillomavirus E2 protein and ChIR1. *Virology* 414:1-9.
- Fifis T, Gamvrellis A, Crimeen-Irwin B, Pietersz GA, Li J, Mottram PL, McKenzie IF and Plebanski M (2004). Size-dependent immunogenicity: Therapeutic and protective properties of nano-vaccines against tumors. *J. Immunol.* 173: 3148-3154.
- Fournier A, Fleer R, Yeh P and Mayaux JF (1989) The primary structure of the 3-phosphoglycerate kinase *PGK* gene from *Kluyveromyces lactis*. *Nucleic Acids Res* 18:365.
- Frazer IH (1996) Immunology of papillomavirus infection. *Curr Opin Immunol* 8:484-491.
- Freitas AC, Carvalho C, Brunner O, Birgel Jr EH, Libera AMD, Benesi FJ, Beçak W and Stocco dos Santos RC (2003) Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the virus: a discussion about BPV-1. *Braz J Microbiol* 34:76-78.

- Freitas AC, Silva MAR, Jesus ALS, Mariz FC, Cordeiro MN, Albuquerque BMF and Batista MVA (2011) Recent insights into Bovine Papillomavirus. *Afr J Microbiol Res* 5(33):6004-6012.
- Gambhira R, Jagu S, Karanam B, Day PM and Roden R (2009) Role of L2 cysteines in papillomavirus infection and neutralization. *Virology* 6:176.
- Gamvrellis A, Leong D, Hanley JC, Xiang SD, Mottram P and Plebanski M (2004) Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 82:506-516.
- Garcea RL and Gissmann L (2004) Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr Opin Biotechnol* 15(6):513-7.
- Gaukroger J, Chandrachud L, Jarrett WFH, McGarvie GE, Yeudall WA, McCaffery RE, Smith KT and Campo MS (1991) Malignant transformation of a papilloma induced by bovine papillomavirus type 4 in the nude mouse renal capsule. *J Gen Virol* 72:1165-1168.
- Gaukroger JM, Chandrachud LM, O'Neil BW, Grindlay GJ, Knowles G and Campo MS (1996) Vaccination of cattle with bovine papillomavirus type 4 L2 elicits the production of virus neutralizing antibodies. *J Gen Virol* 77:1577-1583.
- Gellissen G (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:741-750.
- Gellissen G, Kunze G, Gaillardin C, Cregg JM, Berardi E, Veenhuis M and van der Klei I (2005) New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – A comparison. *FEMS Yeast Res* 5:1079-1096.
- Gerds V, Jons A and Makoschey B (1997) Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J Gen Virol* 78:2139-2146.
- Goldschmidt MH and Hendrick MJ (2002) Equine sarcoid. In: *Tumours in Domestic Animals*. 4th edition. Iowa State University Press, Iowa, pp 88-89.
- Gottschling M, Göker M, Stamatakis A, Olaf RP, Bininda E, Nindl I and Bravo IG (2011) Quantifying the Phylodynamic Forces Driving papillomavirus Evolution. *Mol Biol Evol* 28(7):2101-2113.
- Gottschling M, Stamataski A, Nindl I, Stockfleth E, Alonso À and Bravo IG (2007) Multiple evolutionary mechanisms drive papillomavirus diversification. *Mol Biol Evol* 24:1242-1258.
- Grange DC, Petronius IS and Van Zyl WH (1996) Expression of a *Trichoderma reesei* xylanase gene (XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 62:1036-1044.
- Haas J, Park EC and Seed B (1996) Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol* 6:315-324.
- Han R, Reed CA, Cladel NM and Christensen ND (1999) Intramuscular injection of plasmid DNA encoding cottontail rabbit papillomavirus E1, E2, E6 and E7 induces T cell-mediated but not humoral immune responses in rabbits. *Vaccine* 17:1558-1566.
- Hanumantha Rao N, Babu PB, Rajendra L, Sriraman R, Pang YS, Schiller JT and Srinivasan VA (2011) Expression of codon optimized major capsid protein (L1) of human papillomavirus type 16 and 18 in *Pichia pastoris*; purification and characterization of the virus-like particles. *Vaccine* 29(43):7326-34.
- Hatama S, Nobumoto K and Kanno T (2008) Genomic and phylogenetic analysis of two novel bovine papillomaviruses, BPV-9 and BPV-10. *J Gen Virol* 89:158-163.

- Hatama S, Ishihara R, Ueda Y, Kanno T and Uchida I (2008) Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. *Arch Virol* 156(7):1281-5.
- Higgins DR, Busser K, Comiskey J, Whittier PS, Purcell TJ and Hoeffler JP (1998) Small vectors for expression based on dominant drug resistance with direct multicopy selection. *Methods Mol Biol* 103:41-53.
- Holland MJ and Holland JP (1978) Isolation and identification of yeast messenger ribonucleic acids coding for enolase, glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase, and phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* 17:4900-4907.
- Horvath CAJ, Boulet GAV, Renoux VM, Delvenne PO and Bogers J-PJ (2010) Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virol J* 7:11.
- Houard S, Heinderyckx M and Bollen A (2002) Engineering of non-conventional yeasts for efficient synthesis of macromolecules: the methylotrophic genera. *Biochimie* 84:1089-1093.
- Howley PM and Lowy DR (2001) Papillomaviruses and their replication. In: Howley PM and Knipe DM (eds) *Fields Virology*. 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 2197-2229.
- Hu J, Han R, Cladel NM, Pickel MD and Christensen ND (2002) Intracutaneous DNA Vaccination with the E8 Gene of Cottontail Rabbit Papillomavirus Induces Protective Immunity against Virus Challenge in Rabbits. *J Virol* 76:6453-6459.
- Jackson ME and Campo MS (1995) Both viral E2 protein and the cellular factor PEBP2 regulate transcription via E2 consensus sites within the bovine papillomavirus type 4 long control region. *J Virol* 10:6038-6046.
- Jagu S, Kwak K, Garcea RL and Roden RB (2010) Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or Capsomeres to broaden protection against HPV infection. *Vaccine* 28:4478-4486.
- Jarrett WFH, O'Neil BW, Gaukroger JM, Laird HM, Smith KT and Campo MS (1990) Studies on vaccination against papillomaviruses: a comparison of purified virus, tumour extract and transformed cells in prophylactic vaccination. *Vet Rec* 126:449-452.
- Jarrett WFH, Smith KT, O'Neil BW, Gaukroger JM, Chandrachud LM, Grindlay GJ, et al. (1991) Studies on vaccination against papillomaviruses: prophylactic and therapeutic vaccination with recombinant structural proteins. *Virology* 184:33-42.
- Jia R and Zheng Z-M (2009) Regulation of bovine papillomavirus type 1 gene expression by RNA processing. *Front Biosci* 14:1270-1282.
- Kadaja M, Silla T, Ustav E and Ustav M (2009) Papillomavirus DNA replication - From initiation to genomic instability. *Virology* 384:360-368.
- Kalinna BH (1997) DNA vaccines for parasitic infections. *Immunol Cell Biol* 75:370-375.
- Kanodia S, Fahey LM and Kast WM (2007) Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets* 7(1):79-89.
- Karanam B, Jagu S, Huh WK and Roden RBS (2009) Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunol Cell Biol* 87:287-299.

- Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR and Schiller JT (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:12180-12184.
- Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, Wagner ER, Grindlay GJ, Armstrong A, McGarvie GM, Schiller JT, Lowy DR and Campo MS (1996) Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology* 219:37-44.
- Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Dürst M, Gissmann L, Lowy DR and Schiller JT (1993) Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 67:6929-6936.
- Knowles G, Chandrachud LM, O'Neil BW, Grindlay GJ and Campo MS (1997) Linear B-cell epitopes in the N-terminus of L2 of bovine papillomavirus type 4. *Res Vet Sci* 62:289-291.
- Kohl TO, Hitzeroth II, Christensen ND and Rybicki EP (2007) Expression of HPV-11 L1 protein in transgenic *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *BMC Biotechnol* 7:56.
- Konya J and Dillner J (2001) Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv Cancer Res* 82:205-238.
- Kotzé L, Smith JJ, Haan R, Van Zyl WH and Görgens JF (2011) Expression of human papillomavirus type 16 (HPV16) L1 protein in *Pichia pastoris*. *Afr J Biotechnol* 10(2):214-219.
- Kurtzman CP and Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:331-371.
- Lambert PF (1991) Papillomavirus DNA replication. *J Virol* 35:3417-3420.
- Laniosz V, Holthusen KA and Meneses PI (2008) Bovine papillomavirus type 1: from clathrin to caveolin. *J Virol* 82:6288-6298.
- Leal AM, Ferraz OP, Carvalho C, Freitas AC, Beniston RG, Beçak W, Campo MS and Stocco dos Santos RC (2003) Quercetin induces structural chromosome aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4. *Vet Comp Pathol* 1:15-21.
- Liao JCF, Gregor P, Wolchok JD, Orlandi F, Craft D, Leung C, Houghton AN and Bergaman PJ (2006) Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibodies responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immunity* 6(8):2-10.
- Lin CT, Tsai YC, He L, Calizo R, Chou HH, Chang TC, Soong YK, Hung CF, Lai CH (2006) A DNA vaccine encoding a codon-optimized Human Papillomavirus Type 16 E6 gene enhances CTL response and anti-tumor activity. *J Biomedical Science* 13:481-488.
- Lindsey CL, Almeida ME, Vicari CF, Carvalho C, Yagui A, Freitas AC, Beçak W and Stocco dos Santos RC (2009) Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. *Genet Mol Res* 8:310-318.
- Liu DW, Zhang Y, Yu X, Jiang CL, Yu X, Jiang CL, Chen Y, Wu Y, Jin Y, Niu J, Qu N, Liu M and Kong W (2007) Assembly and Immunogenicity of Human Papillomavirus Type 16 Major Capsid Protein (HPV16 L1) in *Pichia pastoris*. *Chem Res Chinese Universities* 23(2):200-203.
- Liu H, Tan X, Russell KA, Veenhuis M and Cregg JM (1995) PER3, a gene required for peroxisome biogenesis in *Pichia pastoris*, encodes a

- peroxisomal membrane protein involved in protein import. *J Biol Chem* 270(18):10 940.
- Liu HL, Li WS, Lei T, Zheng J, Zhang Z, Yan XF, Wang ZZ, Wang YL and Si LS (2005) Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in transgenic tobacco plants. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37:153-158.
- Liu MA (2003) DNA vaccine: a review. *J Internal Med* 253:402-410.
- Liu M, Acres B, Balloul JM, Bizouarne N, Paul S, Slos F, Squiban P (2004a) Gene-based vaccines and immunotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(2):14567-14571.
- Liu RS, Yang KY, Lin J, Lin YW, Zhang ZH, Zhang J and Xia NS (2004b) High-yield expression of recombinant SARS coronavirus nucleocapsid protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *World J Gastroenterol* 10:3602-3607.
- Lunardi M, Alfieri AA, Otonel RAA, Alcântara BK, Rodrigues WB, Miranda AB and Alfieri AF (2013) Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet Microbiol* 162(1):207-13.
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B and Harvey LM (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22:249-270.
- Masuda Y, Patk SM, Ohkuma M, Ohta A and Takagi M (1994) Expression of an endogenous and a heterologous gene in *Candida maltosa* by using a promoter of a new-isolated phosphoglycerate kinase (*PGK*) gene. *Curr Genetics* 25:412- 417.
- Marchetti B, Ashrafi GH, Tsirimonaki E, O'Brien PM and Campo MS (2002) The papillomavirus oncoprotein E5 retains the major histocompatibility class I in the Golgi apparatus and prevents its transposition to the cell surface. *Oncogene* 21:7808-7816.
- McGarvie GM, Grindlay GJ, Chandrachud LM, O'Neil BW, Jarrett WFH and Campo MS (1995) T-cell responses to BPV-4 E7 in vaccinated and non vaccinated cattle during the course of BPV-4 infection and identification of T-cell epitopes. *Virology* 206:504-510.
- Modis Y, Trus BL and Harrison SC (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal* 21(18):4754-4762.
- Montor WR and Sogayar MC (2003) Insetos como biofábricas de proteínas humanas. *Ciência Hoje* 33(196):16-23.
- Morton CL and Potter PM (2000) Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda*, and COS7 cells for recombinant gene expression. Application to a rabbit liver carboxylesterase. *Mol Biotechnol* 16:193-202.
- Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M and Zaczyn VL (2001) Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 20(54):7888-98.
- Munger K and Howley PM (2002) Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89:213-228.
- Muñoz N (2000) Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 19:1-5.
- Nardelli-Haeffliger D, Roden RB, Benyacoub J, Sahli R, Kraehenbuhl JP, Schiller JT, Lachat P, Potts A and De Grandi P (1997) Human papillomavirus type 16 virus-like particles expressed in attenuated *Salmonella typhimurium* elicit mucosal and systemic neutralizing antibodies in mice. *Infect Immun* 65:3328-3336.

- Nasir L and Campo MS (2008) Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Vet Dermatol* 19(5):243-254.
- Nasir L and Reid SWJ (1999) Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. *Virus Res* 61(2):171-175.
- Nicholls PK and Stanley MA (2000) The immunology of animal papillomaviruses. *Vet Immunol Immunopathol* 73:101-127.
- Noad R and Roy P (2003) Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiol* 11(9):438-444.
- O'Brien and Campo MS (2002) Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus Res* 88(1-2):103-17.
- Ogawa T, Tomita Y, Okada M, Shinozaki K, Kubonoya H, Kaiho I and Shirasawa H (2004) Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virol* 85:2191-2197.
- Ogawa T, Tomita Y, Okada M and Shirasawa H (2007) Complete genome and phylogenetic position of bovine papillomavirus type 7. *J Gen Virol* 88:1934-1938.
- Olson CJr and Cook RH (1951) Cutaneous sarcoma-like lesions of the horse caused by the agent of bovine papilloma. *Proc Society for Exp Biol Med* 77:281-4.
- Palker TJ, Monteiro JM, Martin MM, Kakareka C, Smith JF, Cook JC, Joyce JG and Jansen KU (2001) Antibody, cytokine and cytotoxic T lymphocyte responses in chimpanzees immunized with human papillomavirus virus-like particles. *Vaccine* 19(27):3733-43.
- Park M-A, Kim HJ and Kim H-J (2008) Optimum conditions for production and purification of human papillomavirus type 16 L1 protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* 59:175-181.
- Pastrana DV, Gambhira R, Buck CB, Pang YY, Pang YY, Thompson CD, Culp TD, Christensen ND, Lowy DR, Schiller JT and Roden RB (2005) Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. *Virology* 337:365-372.
- Pennie WD, Grindlay GJ, Cairney M and Campo MS (1993) Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4. *Virology* 19:614-620.
- Pilacinski WP, Glassman DL, Glassman KF, Reed DE, Lum MA, Marshall RF, et al. (1986) Immunization against bovine papillomavirus infection. *Ciba Found Symp* 120:136-156.
- Ramshaw IA, Fordham SA, Bernard CA, Maguire D, Cowden WB and Willenborg DO (1997) DNA vaccine for the treatment of autoimmune disease. *Immunol Cell Biol* 75:409-413.
- Resina D, Serrano A, Valero F and Ferrer P (2004) Expression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* under control of the nitrogen source-regulated formaldehyde dehydrogenase promoter. *J Biotechnol* 109(1-2):103-113.
- Richards RM, Lowy DR, Schiller JT and Day PM (2006) Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1522-1527
- Roden RB, Yutzy WI, Fallon R, Inglis S, Lowy DR and Schiller JT (2000) Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology* 270:254-257.

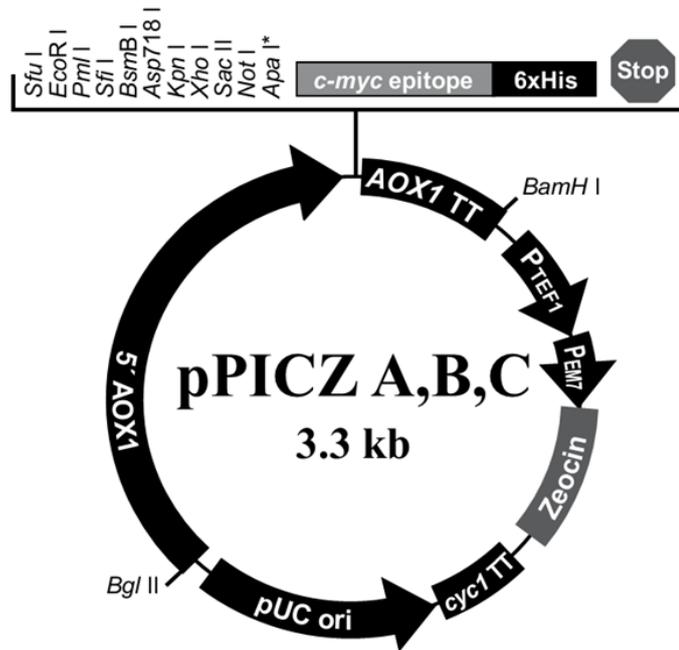
- Rodrigues Júnior JM, Lima KM, Castelo AAM, Martins LDB, Santos SAS, Faccioli LH and Silva CL (2004) É possível uma vacina gênica auxiliar no controle da tuberculose? *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 30:468-477.
- Rogers A, Waltke M and Angeletti PC (2011) Evolutionary Variation of Papillomavirus E2 Protein and E2 Binding Sites. *Virology* 438:379.
- Roperto S, Brun R, Paolini F, Urraro C, Russo V, Borzacchiello G, Pagnini U, Raso C, Rizzo C, Roperto F and Venuti A (2008) Detection of bovine papillomavirus type 2 in the peripheral blood of cattle with urinary bladder tumours: possible biological role. *J Gen Virol* 89:3027-3033.
- Sasagawa T, Pushko P, Steers G, Gschmeissner SE, Gschmeissner SE, Hajibagheri MA, Finch J, Crawford L and Tommasino M (1995) Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* 206:126-135.
- Schapiro F, Sparkowski J, Adduci A, Schlegel R and Grinstein S (2000) Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. *J Cell Biol* 148:305-315.
- Schiller JT and Lowy DR (2001) Papillomavirus-like particle based vaccines: cervical cancer and beyond. *Expert Opin Biol Ther* 1(4):571-81.
- Schiller JT, Vass WC, Vousdan KH and Lowy DR (1986) The E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J Virol* 57:1-6.
- Schlegel R, Wade-Glass M, Rabson MS and Yang YC (1986) The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small hydrophobic polypeptide. *Science* 233:464-467.
- Schrijver RS, Langedijk JP, Keil GM, Middel WG, Kramps JA and van Oirschot JT (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.
- Sears IB, O'connor J, Rossanese OW and Glick BS (1998) A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* 14:783-790.
- Selinka HC, Giroglou T, Nowak T, Christensen ND and Sapp M (2003) Further evidence that papillomavirus capsids exist in two distinct conformations. *J Virol* 77:12961-12967.
- Shah SD, Doorbar J and Goldstein RA (2010) Analysis of host-parasite incongruence in Papillomavirus evolution using importance sampling. *Mol Biol Evol* 27:1301-1314.
- Shuler ML and Kargi F (2001) Utilizing Genetically Engineered Organisms. In: *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. 2nd edition. Prentice Hall.
- Sparkowski J, Anders J and 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.
- Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wierschke JD, Subramaniam A and Birkenberger LA (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190:55-62.
- Streatfield SJ, Toews S and Roberts DF (1992) Functional analysis of the expression of the 3-phosphoglycerate kinase pgk gene in *Aspergillus nidulans*. *Mol Gen Genet* 233:231-240.
- Stocco dos Santos RC, Lindsey CJ, Ferraz O, Pinto JR, Mirandola RS, Benesi FJ, Birgel EH, Bragança CA and Beçak W (1998) Bovine papillomavirus

- transmission and chromosomal aberrations: a experimental model. *J Gen Virol* 79:2127-2135.
- Strasser AWM and Gellissen G (1998) Yeast expression systems and their competitive environment. *Pharm Manuf Int* 3:151-152.
- Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, Newsome JA, Jenson AB and 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.
- Swartz JR (1996) *Escherichia coli* recombinant DNA technology. In: Neidhardt FC (ed) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd edition. American Society of Microbiology Press, Washington DC, pp 1693-1771.
- Tindle RW (1996) Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr Opin Immunol* 8:643-650.
- 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.
- Torrontegui BO and Reid SJ (1994) Clinical and pathological epidemiology of the equine sarcoid in a referral population. *Equine Vet Educ* 6:85-88.
- Tong X, Salgia R, Li JL, Griffin JD and Howley PM (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.
- Varsani A, Williamson AL, Stewart D and Rybicki EP (2006) Transient expression of Human papillomavirus type 16 L1 protein in *Nicotiana benthamiana* using an infectious tobamovirus vector. *Virus Res* 120:91-96.
- Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S and Khanna N (2001) Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 21:71-80.
- Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS and Borzacchiello G (2011) Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol. Cancer* 10:140.
- Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM and Charoenvit Y (1998) Induction of antigen specific cytotoxic T lymphocytes in humans by malaria DNA vaccine. *Science* 282:476-480.
- Wang S, Farfan-Arribas DJ, Shen S, Chou THW, Hirsch A, He F and Lu S (2005) Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine* 24(21):4531- 4540.
- Yang L, Li R, Mohr IJ, Clark R and Botchan MR (1991) Activation of BPV-1 replication *in vitro* by the transcription factor E2. *Nature* 353(6345):628-32.
- Zhang W, Bevins MA, Plantz BA, Smith LA and Meagher MM (2000) Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of *Botulinum* neurotoxin Serotype A. *Biotechnol and Bioengineering* 70(1):1-8.
- Zhang X, Divangahi M, Ngai P, Santosuosso M, Millar J, Zganiyaz A, Wang J, Bramson J and Xing Z (2007a) Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: Enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene. *Vaccine* 25(7):1342-1352.

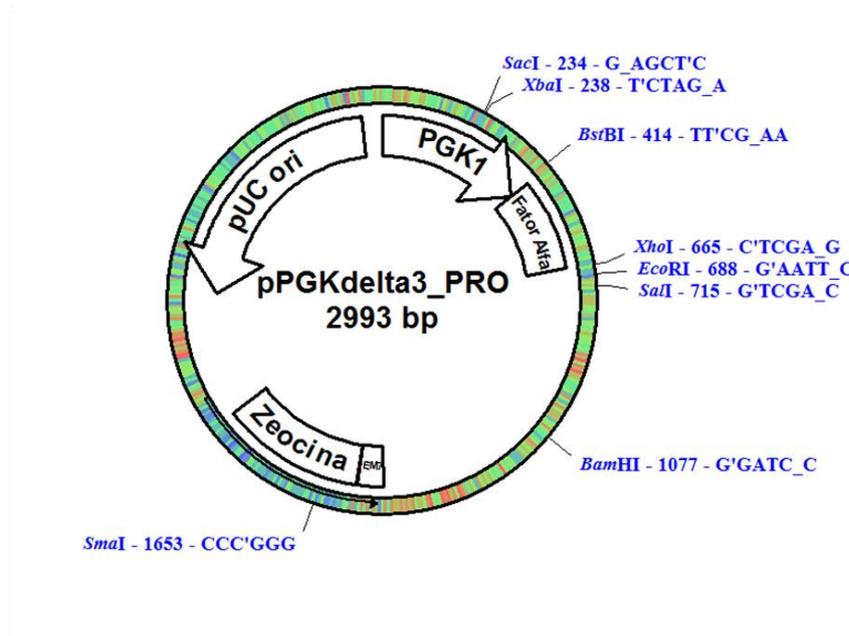
- Zhang Y, Liu R and Wu X (2007b) The proteolytic systems and heterologous proteins degradation in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Annals of Microbiol* 57:553-560.
- Zheng Z-M and Baker CC (2006) Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci* 11:2286-2302.
- Zhou J, Liu WJ, Peng SW, Sun XY and Frazer I (1999) Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *J Virol* 73:4972-4982.
- Zhu W, Dong J, Shimizu E, Hatama S, Kadota K, Goto Y and Haga T (2011) Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. *Arch Virol* 157:85-91.
- Zimmermann H, Koh CH, Degenkolbe R, O'Connor MJ, Muller A, Steger G, Chen JJ, Lui Y, Androphy E and Bernard HU (2000) Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. *J Gen Virol* 81:2617-2623.

9. Anexos

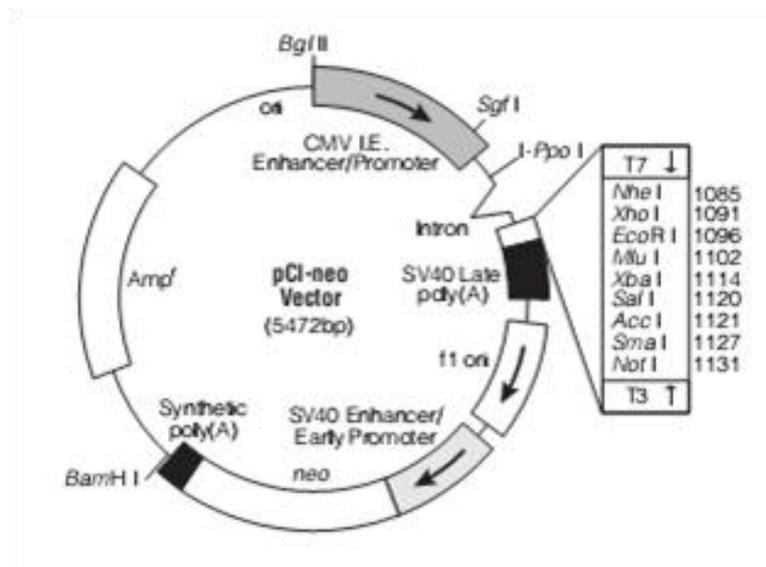
ANEXO A. Mapas dos vetores pPICZ (Invitrogen), pPGKΔ3 e pCI-neo (Promega).



Vetor pPICZ para expressão em levedura *Pichia pastoris*. O vetor contém a sequência promotora do gene AOX1 (AOX1 5'); sítios de clonagem para inserção do gene heterólogo; sequência de término da transcrição do gene AOX1; epitopo c-myc; tag de 6 histina em sequência (6xHis); sequência pUC ori para replicação em *E. coli*; e gene *Sh ble* do *Streptoalloteichus hindustanus* que confere resistência à Zeocina. (Foto retirada do Manual *EasySelect Pichia Expression Kit*, da Invitrogen).



Vetor pPGKΔ3 para expressão em levedura *Pichia pastoris*. O vetor contém a sequência promotora do gene *PGK1*; sítios de clonagem para inserção do gene heterólogo; sequência do peptídeo pré-pro do fator-α de *S. cerevisiae* para secreção da proteína alvo; tag de 6 histina em sequência (6xHis); sequência pUC ori para replicação em *E. coli*; e gene *Sh ble* do *Streptoalloteichus hindustanus* que confere resistência à Zeocina.



Vetor pCI-neo para expressão em células de mamífero. O vetor contém a sequência promotora/acentuadora de citomegalovírus (CMV); sítios de clonagem para inserção do gene heterólogo; sequência de término da transcrição do SV40 (SV40 Late polyA); sequência do fago f1 ori para replicação em *E. coli*; gene da neomicina fosfotransferase que confere resistência à geneticina (G418); e gene da β-lactamase (AmpR) que confere resistência à ampicilina. (Foto retirada do Manual *pCI-neo Mammalian Expression Vector*, da Promega).

ANEXO B. Artigos Científicos publicados em colaboração relacionados a Tese.

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2011) 44: 1209-1214
ISSN 0100-879X

Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector

E.C. Coimbra¹, F.B. Gomes¹, J.F. Campos¹, M. D'arc¹, J.C. Carvalho¹, F.C. Mariz¹, A.L.S. Jesus¹, R.C. Stocco², W. Beçak² and A.C. Freitas¹

¹Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil
²Laboratório de Genética, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

Abstract

Human papillomavirus (HPV) infection is the most common sexually transmitted disease in the world and is related to the etiology of cervical cancer. The most common high-risk HPV types are 16 and 18; however, the second most prevalent type in the Midwestern region of Brazil is HPV-33. New vaccine strategies against HPV have shown that virus-like particles (VLP) of the major capsid protein (L1) induce efficient production of antibodies, which confer protection against the same viral type. The methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is an efficient and inexpensive expression system for the production of high levels of heterologous proteins stably using a wild-type gene in combination with an integrative vector. It was recently demonstrated that *P. pastoris* can produce the HPV-16 L1 protein by using an episomal vector associated with the optimized L1 gene. However, the use of an episomal vector is not appropriate for protein production on an industrial scale. In the present study, the vectors were integrated into the *Pichia* genome and the results were positive for L1 gene transcription and protein production, both intracellularly and in the extracellular environment. Despite the great potential for expression by the *P. pastoris* system, our results suggest a low yield of L1 recombinant protein, which, however, does not make this system unworkable. The achievement of stable clones containing the expression cassettes integrated in the genome may permit optimizations that could enable the establishment of a platform for the production of VLP-based vaccines.

African Journal of Microbiology Research Vol. 5(33), pp. 6004-6012, 31 December, 2011
Available online at <http://www.academicjournals.org/AJMR>
DOI: 10.5897/AJMRX11.020
ISSN 1996-0808 ©2011 Academic Journals

Review

Recent insights into Bovine Papillomavirus

Freitas, A. C.*, Silva M. A. R., Jesus, A. L. S., Mariz, F. C., Cordeiro, M. N., Albuquerque, B. M. F. and Batista, M. V. A

Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Center for Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

Accepted 22 November, 2011

Bovine papillomaviruses (BPV) are double-stranded DNA viruses that infect the cutaneous and mucosal epithelia inducing hyperplastic lesions in cattle. BPV is the etiologic agent of the papillomatosis and neoplasia of the upper gastrointestinal tract and urinary bladder. The benign and malignant tumors caused by BPV are emergent diseases important for beef and dairy cattle in the world. Although BPV associated tumors have veterinary and agricultural relevance, they have also been studied as a relevant model of human papillomavirus (HPV). Recent studies in BPV biology have shown a great diversity of BPV types and new putative BPV types infecting and co-infecting the herd in several parts of the world. This review will briefly summarize the genomes and structure of BPV and the bovine papillomatosis; will describe in greater detail the genotypic diversity, BPV cross-species infection, relevant aspects of BPV and co-infection and its possible routes of transmission. These new approaches about BPV may be very useful to understand the oncogenic potential of the virus, the relationship between virus and co-factors, and the development of anti-viral vaccines.

Key words: Bovine papillomavirus, co-infection, virus transmission, BPV diversity.



Vaccine Strategies against Human Papillomavirus: A Discussion Focused on Developing Countries

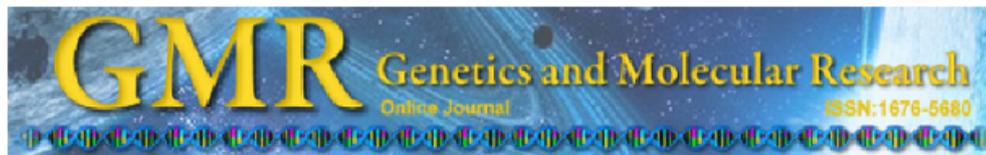
Antonio Carlos de Freitas*, Filipe Colaço Mariz, Eliane Campos Coimbra, Marcelo Nazário Cordeiro and André Luiz Santos de Jesus

Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy, Department of Genetics, Center of Biological Science, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Nelson Chaves s/n, Cidade Universitária 50732-970, Recife – PE, Brazil

Abstract

Cervical cancer is the second most common form of cancer among women, and responsible for 274,000 deaths each year, most of which occur in developing countries. Persistent infection with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) is an essential factor in the development of cervical cancer and also a contributory factor in other types of cancer. The current prophylactic HPV vaccines provide protection against the -16 and -18 genotypes which are most commonly associated with cervical cancer worldwide. However, the increased costs of these vaccines inhibit their implementation in developing countries, affecting their viability. Moreover, a therapeutic vaccine is needed for women who are already infected by HPV and/or affected by HPV-related cancer. A number of innovative approaches to combat and treat HPV infection are currently being studied and some of these will be considered in this work, together with the development of new vaccines, especially in seriously affected areas located in developing countries. At the same time, there will be a discussion of the issues involved in carrying out effective HPV vaccination programs; these will take account of financial constraints, the lack of adequate infrastructure and the competing priorities, that are found in the surrounding social context of the developing countries.

ANEXO C. Instruções para publicação na revista *Genetics and Molecular Research*.



Instructions for Authors

Genetics and Molecular Research (GMR) publishes Book Review, Brief Note, Case Report, Comment, Correction, Errata, Homage, *In Memoriam*, Letter to the Editor, Methodology, Mini-Review, Obituary, Opinion, Point of View, Research Note, Retraction, Review, Review Article, Short Communication, and Thesis Abstract, with regard to genetics, evolution, molecular biology, and bioinformatics. Review articles are normally received by invitation only. If you would like for us to consider a review article, please consult the editor first; send a proposed title, a brief outline and a list of papers relevant to the review published by the author(s). GMR is an exclusively online journal.

The journal is maintained by the not-for-profit scientific foundation Ribeirão Preto Foundation for Scientific Research (FUNPEC-RP) and the articles are open access. **The fee per accepted submission is R\$ 1.380.00 for Brazilian authors and US\$820.00 for authors from other countries. The US dollar amount reflects the approximate current foreign exchange rate and is subject to change.** This fee covers part of the expenses for final language and technical revision, for page setup, and for publishing online.

Payment of the publishing fee should be made by the authors only after receiving a letter of acceptance. After payment is received by our office, the manuscript will be processed further for publication.

Payment, both from within or outside Brazil, should be made by bank transfer (Banco do Brasil or City Bank) or by credit card (Visa and MasterCard).

- [Instructions for payment \(Brazil\)](#).
- [Instructions for payment \(Outside Brazil\)](#).

Please contact the editorial office [gmr@geneticsmr.com] if you have any questions.

All GMR articles must meet the highest standards of scientific quality, both in terms of originality and significance, and the research findings reported should make substantial advances. As it is a journal serving a wide and varied scientific community, article abstracts, introductions and conclusions should be comprehensible to the non-specialist, stressing any wider implications of the study. However, the papers should not compromise on the scientific rigor and detail demanded by an international research journal. The broad readership that GMR attracts gives authors an opportunity to convey to a large audience, as well as to specialists, the importance of their research. The journal is currently indexed in over 64 services; see [<http://www.geneticsmr.com>].

Contributions should be sent either by e-mail as attachments to [gmr@geneticsmr.com] or by regular mail (in files on a CD or DVD) to: Prof. Dr. Francisco A. Moura Duarte, Editor. Rua: Floriano Peixoto, 2444 - Alto da Boa Vista, 14025-220 Ribeirão Preto, SP, Brasil.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been previously published and will not be simultaneously published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries. The use of registered names, trademarks, etc., in this publication

does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

All papers should be prepared in U.S. English. An initial evaluation of the language will be made upon receipt of each manuscript. Those that are considered inadequate for initial review will be returned or sent out for correction, at the discretion of the author. The manuscript will be considered officially received when the corrected version is ready to be sent to the referees.

Before final acceptance, a submission letter with the title of the article and names and signatures of all the authors should be posted to the above address or faxed to the journal at 55 (16) 3621-1991. Galley proofs will be sent in “pdf” form via e-mail for final revision. All authors are co-responsible for their submissions and they should make every effort to check the paper before this final step to avoid costly reformatting and possible introduction of new errors.

GMR articles have no rigid length restrictions. They should contain sufficient technical detail for an expert reader to understand and assess the methods and results. There is no page limit for GMR articles, but authors should still be concise, for two main reasons. First, our electronic refereeing system relies on e-mail, and very large files occasionally cause problems. Second, lengthy manuscripts can be cumbersome to read and study. Referees tend to dislike them, and they take longer to process. In addition, readers of electronic journals often print articles to read them. Remember that a 10,000-word article takes up around 11 pages.

How many pages would you be willing to read on-screen or print out?

Editorial policies: GMR is a refereed journal. Only original manuscripts will be considered for publication. Manuscripts will be reviewed by at least two independent reviewers before a decision is made on publication. The whole process is conducted electronically to speed progress and final publication. Papers will be published (placed online), once were fully processed. Papers accepted in their final form from January 1 to March 31 constitute the first issue of each volume, and so on. There are four issues per year.

Manuscripts (in U.S. English), together with a cover letter from the author responsible for all correspondence, should be submitted to the Editor at [gmr@geneticsmr.com] in electronic format as .doc files saved in Microsoft Word 97 for Windows, or later version. Do not use formatting such as Word’s “Heading” or “Style Sheets”. Spelling, punctuation, sentence structure, spacing, length, and consistency of usage in form and descriptions should be checked before submission. Please also check references for accuracy. Ensure that all figures and tables are mentioned in the text, and that all references are cited in the text. Figure and table files (see below) should be separate.

Submission information

Authors are required to provide the following information with their electronic submissions:

Author submitting the article; article title; authors (full list); article type and session; status of article (e.g., new, revised, etc.); postal address; e-mail address; phone number; fax number; names and types of the files sent.

Brazilian authors should not translate their institutional addresses. These should remain in the original (Portuguese) language.

Revised versions: Authors submitting a revised version of an article, must remember to include a list of changes, and replies to the referees (or technical editor). All the files, not just those revised, for the final draft of paper should be sent.

Acknowledgment of electronic submissions: Successful receipt and processing of the author’s submission will be acknowledged by e-mail when the submitted manuscript has

been checked. If no reply has been received within one week, the author should contact the editor at [gmr@geneticsmr.com].

Review: Articles are reviewed anonymously by independent referees. Authors are encouraged to suggest names of expert reviewers, but selection remains the prerogative of the editors. To facilitate the review process, the authors can send supplementary material, such as cited accepted but not yet published papers, which may be important for assessment of the manuscript.

A review article should contain: an abstract of 250 words or less, no more than six key words, a running title and no more than 60 references. It should be divided into sections with appropriate titles and subtitles.

Preparation of the manuscript

Order the sections comprising the manuscript as follows: title, running title, author, address, abstract, key words, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgments, and references.

Title Page: The title page should include the title of the article, authors' names (names and initials (only) thinking in indexing services), and authors' affiliation. The affiliation should comprise the department, institution (usually university or company), city, and state (or nation). The title page should include the name and complete mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address of the author designated to review proofs. A running title of no more than 60 characters (including spaces) should be provided.

Abstract: An abstract of up to 250 words, single-spaced, is required of research articles and reports and should be arranged in one paragraph. The following information (without headings) should be included: purpose, methods, results (please report numerical data (means \pm SE) for significant results), and conclusions. Review articles also require an abstract, which need not include all of these items.

Key words: A list of key words or indexing terms (up to six) should be included.

Text

Format: Headings should be bold, and first letters capitalized and left-aligned. All text should be set in Times New Roman font, 12 point, left-aligned, single-spaced. Do not justify the right margin. Leave only one (1) space after periods. Paragraphs should not be indented; there should not be any blank lines between them. Use line returns only at the end of paragraphs. Do not use tabs or spaces to create indents. Use the Symbol font for symbols and special characters. Do not use equation editors or footnoting utilities. Save equations as images. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page.

Footnotes: Footnotes should be avoided. When their use is absolutely necessary, footnotes should be numbered consecutively using Arabic numerals and should be placed at the bottom of the page to which they refer. Place a line above the footnote, so that it is set off from the text.

Tables/Charts: Special care should be taken to ensure that all tables are properly formatted. Scientific symbols used should be in Symbol or Times New Roman. Tables should be on a separate page, numbered consecutively (with Arabic numerals) referred to by number in the text and designed to fit the column or page size of the journal. Use tables with cells to

separate columns. Do not use spaces, tabs or vertical lines. Left justify the title above the table. Indicate each table's location within the manuscript.

Illustrations: Illustrations/figures (photographs, drawings, diagrams, and charts) should each be in a single file, numbered in a consecutive series of Arabic numerals in the order in which they are cited in the text. Illustrations must be submitted as separate files. All illustrations are to be supplied in JPEG (jpg) format in either color or black and white. Images must be saved as separate, stand-alone files. The image resolution should be 300 dpi. Do not embed images within the text file. The placing of graphics in the paper should be indicated in the text and should include the captions for the figures. The authors should also send, by mail, a printed version of the figures. These should be at least 10 x 15 cm, up to US letter size, so that figures can be scanned (in case the figure files are not adequate) to guarantee good quality for publishing online.

Abbreviations: Try to use abbreviations in the text sparingly. Write out abbreviations in full before the first time they are used in the text. Use the metric system for all measurements without periods (cm, mL, s). Define all symbols used in equations and formulas. Do not abbreviate the word "Figure" or "Table" in titles or text.

Acknowledgments: All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one paragraph directly preceding the reference section. Authors of manuscripts submitted to GMR are requested to state the source of all funding that enabled the described research to be undertaken.

References: References in the text should include the name of the author and the year in parentheses, e.g. (Searle, 1961) or (King and Wilson, 1975). When a reference with more than two authors is cited, only the first author is named, e.g. (Comstock et al., 1958). The references must be cited in the text in chronological order, e.g. (Ideber, 2001; Uetz, 2002; Ottavai, 2004). References to "unpublished results" and "submitted papers" should appear in the text in parentheses following the name(s) of the individual(s). Example: (Pereira KS, Martins PK and Silva TM, unpublished results). **No more than 40 references should be cited in a Full-length paper, 20 references in a Short Communication and 60 references in a Review article.**

References, under the heading "References", should include only works referred to in the text. This section should be arranged in alphabetical order under the first author's last name. References should be cited as follows: journal papers - names and initials of the first four authors (after that using et al.), year, journal title abbreviated according to PubMed or Web of Science, volume number, first and last page numbers; books - names of authors, year, full title, edition, publishers, address (city); articles published in symposia - names of authors, year, full title of book, name(s) of editor(s) in parentheses, publisher, address (city), first and last page numbers.

The references should consist mainly of articles from indexed journals. References for techniques that are essential for understanding or repeating the methods should always be in easily accessible (indexed) journals.

Reference style: The list of references at the end of the paper should follow the format requested by GMR. The link below can be accessed to see how the references should appear.

[Examples of reference style](#)

[General information of GMR style](#)

10. Curriculum vitae (Lattes)

André Luiz Santos de Jesus

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome André Luiz Santos de Jesus
Filiação Luiz Carlos de Jesus e Maria Joselinda Santos de Jesus
Nascimento 01/01/1983 - Aracaju/SE - Brasil
Carteira de Identidade 30052432 SSP - SE - 08/03/2006
CPF 008.506.555-28

Formação acadêmica/titulação

- 2009** Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Desenvolvimento e Avaliação de Estratégias Vacinais contra a Papilomatose Bovina e Sarcóide Equino baseada em virus-like particles e imunização genética
Orientador: Antonio Carlos de Freitas
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2006 - 2008** Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Produção da proteína L1 do Papilomavírus bovino tipo 1 em Pichia pastoris, Ano de obtenção: 2008
Orientador: Antonio Carlos de Freitas
- 2001 - 2005** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Sergipe, UFS, Sao Cristovao, Brasil
Orientador: Alexandre Luna Cândido
-

Formação complementar

- 2012 - 2012** Vacinologia Reversa.
Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia, CBAB, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Mapping of Viral Epitopes....
Sociedade Brasileira de Virologia, SBV, Rio De Janeiro, Brasil
- 2006 - 2006** Extensão universitária em Curso de Verão em Genética.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Proteínas Heterólogas.
Universidade Federal de Sergipe, UFS, Sao Cristovao, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em Virologia Básica.
Universidade Federal de Sergipe, UFS, Sao Cristovao, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2009 - Atual Vínculo: Estudante de Doutorado , Enquadramento funcional: Pesquisador, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

04/2012 - 04/2012 Pós-graduação, Programa de Pós-Graduação em Genética

Disciplinas ministradas:

Biologia Molecular Aplicada à Medicina Veterinária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE (Aula Introdução à Bioinformática)

07/2011 - 07/2011 Pós-graduação, Programa de Pós-Graduação em Genética

Disciplinas ministradas:

Biologia Molecular Aplicada à Medicina Veterinária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE (Aula Introdução à Bioinformática)

04/2010 - 04/2010 Pós-graduação, Programa de Pós-Graduação em Genética

Disciplinas ministradas:

Biologia Molecular Aplicada à Medicina Veterinária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE (Aula Introdução à Bioinformática)

03/2009 - 03/2009 Pós-graduação, Programa de Pós-Graduação em Genética

Disciplinas ministradas:

Professor Auxiliar da disciplina Biologia Molecular Aplicada à Medicina Veterinária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE

04/2007 - 04/2008 Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Genética

Linhas de pesquisa:

Biologia Molecular de Virus do Papiloma

Linhas de pesquisa

1. Biologia Molecular de Virus do Papiloma

Objetivos: Expressão de proteínas do capsídeo de papilomavírus em sistemas de expressão heteróloga (levedura *Pichia pastoris* e bactéria *Escherichia coli*;

Áreas de atuação

1. Genética Molecular e de Microorganismos

2. Biologia Molecular
3. Biologia e Fisiologia dos Microorganismos
4. Imunologia

Projetos

Projetos de pesquisa Projetos de pesquisa **2007 - 2009** Desenvolvimento e avaliação de estratégias vacinais contra o papilomavírus bovino, baseadas em Virus-Like Particles e imunização genética.

Descrição: Construção e avaliação de vetores vacinais contra o papilomavirus bovino.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: André Luiz Santos de Jesus Willy Beçak (Responsável); Antonio Carlos de Freitas

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **JESUS, A.L.S.**, MARIZ, F.C., SOUZA, H.M., CORDEIRO, M.N., COIMBRA, E.C., LEITAO, M.C.G., NASCIMENTO, L.M., STOCCO, R.C., BECAK, W., FREITAS, A.C.

Expression of the bovine papillomavirus type 1, 2 and 4 L1 genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genetics and Molecular Research*. , v.11, p.2598 - 2607, 2012.

2. Silva, M.A.R., SILVA, K.M.G., **JESUS, A.L.S.**, BARROS, L., CORTEGGIO, A., ALTAMURA, G., BORZACCHIELLO, G., Freitas, A.C.

The Presence and Gene Expression of Bovine Papillomavirus in the Peripheral Blood and Semen of Healthy Horses. *Transboundary and Emerging Diseases (Print)*. , v.v, p.n/a - n/a, 2012.

3. FREITAS, A.C., MARIZ, F.C., COIMBRA, E.C., **JESUS, A.L.S.**

Vaccine Strategies against Human Papillomavirus: A Discussion Focused on Developing Countries. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*. , v.S4, p.1 - 8, 2012.

4. COIMBRA, E.C., GOMES, F.B., CAMPOS, J.F., D'ARC, M., CARVALHO, J.C., MARIZ, F.C., **JESUS, A.L.S.**, STOCCO, R.C., BEÇAK, W., FREITAS, A.C.

Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research on line*. , v.44, p.1209 - 1214, 2011.

5. FREITAS, A.C., SILVA, M.A.R., **JESUS, A.L.S.**, MARIZ, F.C., CORDEIRO, M.N., ALBUQUERQUE, B.M.F., BATISTA, M.V.A.

Recent insights into Bovine Papillomavirus. *AFR J MICROBIOL RES*. , v.5, p.6004 - 6012, 2011.

Artigos aceitos para publicação

1. FREITAS, A.C., MARIZ, F.C., SILVA, M.A.R., **JESUS, A.L.S.**

Human Papillomavirus Vertical Transmission: Review of Current Data. *Clinical Infectious Diseases*. , 2013.

2. COUTINHO, L.C.A., **JESUS, A.L.S.**, FONTES, K.F.L.P., COIMBRA, E.C., MARIZ, F.C., FREITAS, A.C., MAIA, R.C.C., CASTRO, R.S.

Production of Equine Infectious Anemia virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*. *Journal of Virological Methods*. , 2013.

3. PONTES, N.E., BARBOSA, C.N., **JESUS, A.L.S.**, SILVA, J.G., FREITAS, A.C.
Development and Evaluation of Single-tube Nested PCR (STNPCR) for the Detection of Porcine Circovirus type 2 (PCV2). *Transboundary and Emerging Diseases* (Print). , 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. CORDEIRO, M.N., COIMBRA, E.C., **JESUS, A.L.S.**, FREITAS, A.C.
Design of HPV-16 E5 gene-based expression vectors for genetic immunization against cervical cancer In: XXIII Congresso Brasileiro de Virologia & VII Encontro de Virologia do Mercosul, 2012, Foz do Iguaçu.
Annals of XXIII Brazilian Congress of Virology & VII Mercosur Meeting of Virology. , 2012. v.17. p.321 - 322
2. SILVA, J.G., COIMBRA, E.C., SILVA, K.M.G., BARBOSA, C.N., **JESUS, A.L.S.**, CASTRO, R.S., FREITAS, A.C.
Expression of Porcine Circovirus type 2 capsid gene in *Pichia pastoris* In: XXIII Congresso Brasileiro de Virologia & VII Encontro de Virologia do Mercosul, 2012, Foz do Iguaçu.
Annals of XXIII Brazilian Congress of Virology & VII Mercosur Meeting of Virology. , 2012. v.17. p.433 - 434
3. SILVA, M.A.R., SILVA, K.M.G., **JESUS, A.L.S.**, BARROS, L.O., CORTEGGIO, A., ALTAMURA, G., BORZACCHIELLO, G., FREITAS, A.C.
Presence and gene expression of Bovine Papillomavirus in peripheral blood and semen of healthy horses In: XXIII Congresso Brasileiro de Virologia & VII Encontro de Virologia do Mercosul, 2012, Foz do Iguaçu.
Annals of XXIII Brazilian Congress of Virology & VII Mercosur Meeting of Virology. , 2012. v.17. p.434 - 435
4. FONTES, K.F.L.P., COUTINHO, L.C.A., **JESUS, A.L.S.**, MARIZ, F.C., FREITAS, A.C., MAIA, R.C.C., CASTRO, R.S.
Cloning and expression of a codon-optimized synthetic gene for p26 protein production of Equine Infectious Anemia Virus in *Escherichia coli* In: XXII Encontro Nacional de Virologia e VI Encontro de Virologia do Mercosul, 2011, Atibaia.
Annals of XXII National Meeting of Virology & VI Mercosur Meeting of Virology. , 2011. v.16. p.235 - 235
5. SILVA, J.G., SILVA, K.M.G., BARBOSA, C.N., PONTES, N.E., **JESUS, A.L.S.**, CASTRO, R.S., FREITAS, A.C.
Construction of expression vector for capsid protein of Porcine Circovirus type 2 in *Pichia pastoris* In: XXII Encontro Nacional de Virologia e VI Encontro de Virologia do Mercosul, 2011, Atibaia.
Annals of XXII National Meeting of Virology & VI Mercosur Meeting of Virology. , 2011. v.16. p.251 - 251
6. ALBUQUERQUE, B.M.F., CRUZ, H.L.A., COIMBRA, E.C., AMARAL, C.M.M., BATISTA, M.V.A., SILVA, M.A.R., **JESUS, A.L.S.**, BALBINO, V.Q., FREITAS, A.C.
Development of a Real time PCR typification/quantification assay for Bovine Papillomavirus In: XXII Encontro Nacional de Virologia e VI Encontro de Virologia do Mercosul, 2011, Atibaia.
Annals of XXII National Meeting of Virology & VI Mercosur Meeting of Virology. , 2011. v.16. p.263 - 263
7. PONTES, N.E., BARBOSA, C.N., **JESUS, A.L.S.**, SILVA, J.G., FREITAS, A.C.
Development of Single-Tube Nested PCR for Porcine Circovirus type 2 detection in clinical samples In: XXII Encontro Nacional de Virologia e VI Encontro de Virologia do Mercosul, 2011, Atibaia.
Annals of XXII National Meeting of Virology & VI Mercosur Meeting of Virology. , 2011. v.16. p.242 - 242

8. **JESUS, A.L.S.**, MARIZ, F.C., SOUZA, H.M., CORDEIRO, M.N., COIMBRA, E.C., NASCIMENTO, L.M., LEITAO, M.C.G., STOCCO, R.C., BECAK, W., FREITAS, A.C.
Expression of Bovine Papillomavirus type 1, 2 and 4 L1 gene in *Pichia pastoris* In: XXII Encontro Nacional de Virologia e VI Encontro de Virologia do Mercosul, 2011, Atibaia.
Annals of XXII National Meeting of Virology & VI Mercosur Meeting of Virology . , 2011. v.16. p.242 - 242
9. LIMA, E.G., **JESUS, A.L.S.**, DHALIA, R., FREITAS, A.C.
Genetic immunization for papillomaviruses control: construction of a vaccinal vector based on the gene L2 of Bovine Papillomavirus type 1 In: XXII Encontro Nacional de Virologia e VI Encontro de Virologia do Mercosul, 2011, Atibaia.
Annals of XXII National Meeting of Virology & VI Mercosur Meeting of Virology . , 2011. v.16. p.247 - 247
10. COUTINHO, L.C.A., FONTES, K.F.L.P., **JESUS, A.L.S.**, COIMBRA, E.C., MARIZ, F.C., FREITAS, A.C., MAIA, R.C.C., CASTRO, R.S.
Production of p26 protein of Equine Infectious Anemia virus in *Pichia pastoris* In: XXII Encontro Nacional de Virologia e VI Encontro de Virologia do Mercosul, 2011, Atibaia.
Annals of XXII National Meeting of Virology & VI Mercosur Meeting of Virology . , 2011. v.16. p.235 - 235
11. COIMBRA, E.C., **JESUS, A.L.S.**, LIMA, E.G., FREITAS, A.C.
Construction and in vitro functional evaluation of a vector for genetic immunization based on the gene E5 of HPV-16 In: 3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia, 2010, Fortaleza.
Anais do 3º Congresso Brasileiro de Biotecnologia . , 2010. p.157 - 157
12. LIMA, E.G., Carvalho, J.C., GOMES, F.B., ALBUQUERQUE, B.M.F., **JESUS, A.L.S.**, FREITAS, A.C.
Construção de um Vetor Gênico para Imunização Genética com o gene L2 do Papilomavírus Bovino tipo 1 In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas-PE.
Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia . , 2009.
13. Carvalho, J.C., **JESUS, A.L.S.**, CORDEIRO, M.N., MARIZ, F.C., COIMBRA, E.C., CAMPOS, J.F., LIMA, E.G., FREITAS, A.C.
Construção do vetor de Expressão pPICZAalfaL1H16 para a Produção Extracelular da proteína L1 de HPV-16 em células da levedura *Pichia pastoris* In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas-PE.
Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia . , 2009.
14. 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 In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas - PE.
Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia . , 2009.
15. BARBOSA, C.N., PONTES, N.E., **JESUS, A.L.S.**, LIMA, E.G., FREITAS, A.C.
Detecção do Circovirus Suíno tipo 1 e 2 no estado de Pernambuco utilizando a reação em cadeia da polimerase In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas - PE.
Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia . , 2009.
16. **JESUS, A.L.S.**, SOUZA, H.M., MARIZ, F.C., COIMBRA, E.C., CAMPOS, J.F., CORDEIRO, M.N., FREITAS, A.C.
Expressão do gene L1 de Papilomavirus Bovino tipo 1 e 4 em levedura *Pichia pastoris* In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas - PE.
Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia . , 2009.
17. COIMBRA, E.C., SOUZA, H.M., Leitao, M.C.G., CAMPOS, J.F., Carvalho, J.C., **JESUS, A.L.S.**, FREITAS, A.C.
Produção da proteína L1 de HPV 16, 18 e 33 em levedura *Pichia pastoris*: base para o desenvolvimento de uma vacina profilática nacional contra o câncer de colo de útero In: 25º

Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas - PE.

Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.

18. MARIZ, F.C., CORDEIRO, M.N., **JESUS, A.L.S.**, CAMPOS, J.F., COIMBRA, E.C., FREITAS, A.C.

Utilização da levedura *Pichia pastoris* no desenvolvimento de um sistema para produção de virus-like particles baseadas na proteína capsidial L1 de BPV2 In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas.

Anais do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. CORDEIRO, M.N., MARIZ, F.C., **JESUS, A.L.S.**, COIMBRA, E.C., GOMES, F.B., FREITAS, A.C.

Intra- and extracellular production of Bovine Papillomavirus type 2 L1 protein in *Pichia pastoris*: a promising platform for production of subunits vaccines against papillomaviruses In: XXII Encontro Nacional de Virologia e VI Encontro de Virologia do Mercosul, 2011, Atibaia.

Annals of XXII National Meeting of Virology & VI Mercosur Meeting of Virology, 2011. v.16. p.41 - 42

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização

1. Breno Moacir Farias de Albuquerque. **Prevalência dos diferentes tipos de papiloma humano nas lesões carcinogênicas em mulheres do estado de Pernambuco**. 2012. Monografia (Habilitação Farmacêutico Bioquímico-Analista) - Universidade Federal de Pernambuco

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **II Jornada de Pós-graduação em Genética**, 2012. (Encontro)

Desenvolvimento e Avaliação de Estratégias Vacinais contra a Papilomatose Bovina e Sarcóide Equino Baseada em Virus-like Particles e Imunização Genética.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIII Congresso Brasileiro de Virologia & VII Encontro de Virologia do Mercosul**, 2012. (Congresso)

Expression of Porcine Circovirus type 2 capsid gene in *Pichia pastoris*.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2011. (Outra)

Expressão do gene L1 de Papilomavírus Bovino tipo 1, 2 e 4 em *Pichia pastoris*.

4. Conferencista no(a) **V Simpósio Sergipano de Microbiologia e I Encontro de Controle de Qualidade Microbiológica**, 2011. (Simpósio)

Expressão heteróloga na levedura *Pichia pastoris*.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXII Encontro Nacional de Virologia e VI Encontro de Virologia do Mercosul**, 2011. (Congresso)

Expression of Bovine Papillomavirus type 1, 2 and 4 L1 gene in *Pichia pastoris*.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **25º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2009. (Congresso)

Expressão do gene L1 de Papilomavirus Bovino tipo 1 e 4 em levedura *Pichia pastoris*.

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Curso de aperfeiçoamento/especialização

1. JESUS, A.L.S., COUTINHO, L.C.A., SILVA, A.B.

Participação em banca de Breno Moacir Farias de Albuquerque. **Prevalência dos diferentes tipos de papiloma humano nas lesões carcinogênicas em mulheres do estado de Pernambuco**, 2012

(Habilitação Farmacêutico Bioquímico-Analista) Universidade Federal de Pernambuco