

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

ELYDA GONÇALVES DE LIMA

**IMUNIZAÇÃO GENÉTICA PARA O CONTROLE DE
PAPILOMAVIROSES: CONSTRUÇÃO DE UM
VETOR VACINAL BASEADO NO GENE L2 DO
PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPO 1.**

RECIFE

2011

ELYDA GONÇALVES DE LIMA

**IMUNIZAÇÃO GENÉTICA PARA O CONTROLE DE
PAPILOMAVIROSES: CONSTRUÇÃO DE UM VETOR
VACINAL BASEADO NO GENE L2 DO PAPILOMAVÍRUS
BOVINO TIPO 1.**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Mestre (Doutor) em Inovação Terapêutica**

Orientador: Prof.Dr. Antonio Carlos de Freitas

RECIFE

2011

Catálogo na fonte

Elaine Barroso
CRB 1728

Lima, Elyda Gonçalves de

Imunização genética para o controle de papilomavíroses: construção de um vetor vacinal baseado no Gene L2 do papilomavírus bovino tipo 1/ Elyda Gonçalves de Lima– Recife: O Autor, 2011.

84 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Inovação Terapêutica, 2011.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. Papilomavírus-vacina 2. DNA 3. Genes I. Freitas, Antonio Carlos (orientador) II. Título**

579.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 203

Lima, E.G.	Imunização genética para o controle de papilomavíroses: construção de um vetor vacinal baseado no gene L2 do <i>Papillomavírus bovino</i> tipo 1.		Mestrado PPGITUFPE 2011
------------	---	--	-------------------------------

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Ângela Maria Isidro Farias

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dra. Silvia Regina Arruda de Moraes

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Profa. Dra. Suely Lins Galdino

VICE- COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Profa. Dra. Ana Cristina de Almeida Fernandes

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: LIMA, Elyda Gonçalves

Título: Imunização genética para o controle de papilomavíroses: construção de um vetor vacinal baseado no gene L2 do *Papilomavírus bovino* tipo 1.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 16/03/2011

Banca Examinadora

Prof(o). Dr. Antonio Carlos de Freitas

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (Membro interno)

Assinatura: _____

Prof(o). Dr. Roberto Soares de Castro

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco (Membro externo)

Assinatura: _____

Prof(o). Dr. Tercílio Calsa Júnior

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco (Membro externo)

Assinatura: _____

“Faça da queda um passo de dança,
do medo uma escada, do sonho
uma ponte, da procura um encontro.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as conquistas alcançadas.

Gostaria de agradecer aos meus pais pelo apoio dado, ao meu pai, Ednaldo, pelo carinho e financiamento de toda uma vida. A minha mãe, Eliane, pelo amor incondicional e por sempre acreditar nos meus sonhos. Ao meu irmão, Euler, pelo carinho e alegria principalmente em grandes momentos de descontração. Ao meu irmão caçula, Elton, pelo seu amor, carisma e compreensão.

Agradeço a toda minha família, em especial, minha tia Antonia Cristina, meus primos Synara e Serginho, meus tios Marcelo, André e Alexandre e a “agregada” Cidicléia pelo apoio e a perseverante e fiel torcida.

Ao meu orientador, Dr. Antonio Carlos de Freitas, pelos ensinamentos, pela confiança depositada, paciência e oportunidade de novos conhecimentos.

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

Aos colegas que conquistei e que muito colaboraram no meu desenvolvimento e aprendizado no LaViTE, Georgia, Renato, Isabelle, Mayara, Amanda, Sabrina, Clintiano, Verônica e Sandra. Agradecimento especial a Mariana, por tanta paciência, companheirismo e pelos ensinamentos prestados.

As minhas grandes amigas da Paraíba, Michelle e Polyanna pelo carinho, apoio e principalmente pelos grandes momentos de celebração, o fato de estarmos juntas é sempre motivo de festa.

Agradeço ao meu companheiro, meu amigo Felipe Barbosa (Companheiro), pela sua amizade, pelos seus “ouvidos emprestados” para grandes desabaços e por longínquas horas de conversas, pelos valiosos momentos de lazer e aventura, pelas suas piadas que só eu, como boa amiga, encontro graça e por compartilhar tantas experiências inusitadas juntos.

A minha primeira Co-orientadora Rafaelle (Rafis), pelos seus preciosos ensinamentos, paciência e dedicação prestada.

Ao “MEU” estagiário, Breno Moacir, pela incondicional consideração e pelos seus infinitos questionamentos que me fizeram refletir e muitas vezes filosofar, tentando ensinar tudo que aprendi da melhor forma possível.

Aos meus amigos que muito me ensinaram praticamente Co-orientadores, exemplos como pessoa e profissionais, André, Angélica e Eliane, pela dedicação e pelos inúmeros momentos de descontração.

Aos meus queridos amigos de laboratório, Janaine pelos inúmeros momentos deliciosos de compras e brindes. As Gracinhas 2 e 3, Carolina e Jaqueline, sem elas o laboratório perderia muito de sua graça e espontaneidade. Aos adoráveis amigos Filipe (Los), Luciana, Marcelo, Billy e a mais recente e grandiosa aquisição Pavla pelos ensinamentos e companheirismo. Aos caros integrantes do LGM (agora LEMTE) e associados, Barbara, Cybelle, Nayara, Karin, Karen, Rochane, Brígida, Rute e Fernanda.

Aos amigos da primeira turma de mestrado do PPGIT pela amizade e companheirismo.

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

Agradeço a todos os meus amigos citados ou não, que direta ou indiretamente me apoiaram e estiveram presentes em várias etapas importantes da minha vida e que influenciaram o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

LIMA, E.G. Imunização genética para o controle de papilomavíroses: construção de um vetor vacinal baseado no gene L2 do *Papilomavírus bovino* tipo 1. 2011. 97f. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. No entanto, algumas doenças vêm causando prejuízos consideráveis entre elas está a papilomatose bovina, uma doença infectocontagiosa, de caráter tumoral, com etiologia relacionada a infecção pelo papilomavírus bovino (BPV) que se caracteriza pela formação de tumores em tecidos da pele e mucosa. Hoje se conhecem 11 tipos diferentes de Papilomavírus bovino, sendo os BPVs tipos 1, 2 e 4 oncogênicos. Até o momento não existe vacinas para o controle ou tratamento das papilomavíroses. Diferentes estudos vêm demonstrando que a proteína L2 pode ser uma candidata ao desenvolvimento de estratégias vacinais profiláticas contra o BPV. Neste trabalho, tivemos como objetivo construir um vetor vacinal a partir do plasmídeo pCIneo (Promega[®]) e do gene L2 de BPV1, avaliando *in vitro* a expressão do antígeno L2 em células de mamíferos. O gene L2 foi amplificado pela técnica de PCR a partir do genoma completo de BPV1, com uso de oligonucleotídeos específicos contendo um epítopo AU1 no *primer forward* e posteriormente clonado em vetor de passagem pGEM-T Easy (Promega[®]) e subclonado no vetor de expressão pCIneo, gerando a construção pCIL2B1. O plasmídeo foi transfectado *in vitro* em células 293 para análise funcional da expressão de L2. Os resultados obtidos confirmaram a construção pCIL2B1 por PCR e sequenciamento. A capacidade desta construção expressar o gene L2 e produzir a respectiva proteína em células de mamífero foi confirmada por RT-PCR e western blot (usando anticorpo contra o epítopo AU1).

Palavras-chave: Gene L2. *Papilomavírus bovino*. Vacina de DNA.

ABSTRACT

LIMA, E.G. Dissertation. Genetic immunization for papillomaviruses control: construction of a vaccinal vector based on the gene L2 *bovine papillomavirus* type 1. 2011. 97f. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

The cattle industry is one of the main highlights of the Brazilian agribusiness on the international stage. However, some diseases have caused considerable damage including bovine papillomatosis which is an infectious tumorous disease related to bovine papillomavirus (BPV) etiology and characterized by the formation of tumors in tissues of the skin and mucosa. Currently we know 11 different types of bovine papillomavirus, among which the BPV types 1, 2 and 4 are oncogenic. So far there is no vaccine or treatment for the papillomaviruses control. Different studies have reported that the L2 protein may be a candidate for the development of prophylactic vaccine strategies against BPV. The L2 protein has a potential cross-reaction with different BPVs and HPV (*Human Papillomavirus*). On this paper, our objective was to construct a vector vaccine from pCIneo plasmid (Promega ®) and the gene of BPV1 L2, evaluating in vitro L2 antigen expression in mammalian cells. The L2 gene was amplified by PCR from the complete genome of BPV1, using specific oligonucleotides containing an AU1 epitope in the forward primer and subsequently cloned into pGEM-T Easy vector (Promega ®) and subcloned in expression vector pCIneo, pCIL2B1 generating building. The plasmid was transfected into 293 cells in vitro functional analysis for the expression of L2. Obtaining construction pCIL2B1 was confirmed by PCR and sequencing. The capacity of this construction to express the gene and produce their L2 protein in mammalian cells was confirmed by RT-PCR and western blot (using antibody against the epitope AU1). The results confirmed the L2 gene expression in mammalian cells and the consequent production of the protein L2 BPV-1.

Keywords: Gene L2. *Bovine papillomavirus*. DNA vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Capsômero e capsídio não-envelopado (PEREIRA <i>et al.</i> , 2009).	9
Figura 2. Mapa genômico característico dos Papilomavírus (PV)	9
Figura 3. Lesões em bovinos associadas à infecção por BPVs	13
Figura 4. Lesões em bovinos associadas à infecção por BPVs	13
Figura 5. Árvore filogenética	14
Figura 6. Ciclo de infecção do PV.	17
Figura 7. Modelo de entrada do HPV na célula.	19
Figura 8. Capsídeo icosaédrico do Papilomavírus bovino	25
Figura 9. Ilustração da estrutura do capsídeo viral.....	26
Figura 10. Indução da imunidade humoral e celular pela vacina de DNA.	33
Figura 11. Mapa do vetor circular pGEM-T Easy	42
Figura 12. Mapa do vetor circular pCI-neo	44
Figura 13. Amplificação do gene L2 de BPV-1 por PCR.	52
Figura 14. Digestão do DNA plasmidial extraído.	53
Figura 15. Quantificação do gene L2 do BPV-1 e do pCI-Neo	54
Figura 16. Esquema da PCR para detecção do clone pCIL2B1.	54
Figura 17. PCR de colônia evidenciando o gene L2 da construção pCI-L2B1.	55
Figura 18. Construção do vetor pCIL2B1neo.	55
Figura 19. Avaliação da eficiência de transfecção.	56
Figura 20. RT-PCR das células transfectadas com 293.	57
Figura 21. PCR das construções transfectadas com 293 sem transcriptase...	58
Figura 22. Análise por eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE.....	59

Figura 23. Western blot da proteína L2 de BPV-1	60
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Resumo das diferentes vias de administração para vacinas de DNA	37
Tabela 02: Sequência dos <i>primers</i> para amplificação do fragmento L2.	41
Tabela 03: Reação de PCR com os primers específicos.....	41
Tabela 04: Reação de digestão do pGEM-L2B1 e pCI-neo	44
Tabela 05: Reação de ligação do vetor pCI-neo e fragmento L2.....	45
Tabela 06: Reação de digestão do pCI-L2B1	45
Tabela 07: Reação de PCR para os primers de detecção e orientação do fragmento L2	46
Tabela 08: Digestão para verificar orientação do fragmento L2	46
Tabela 09: Sequência dos <i>primers</i> para detecção do fragmento L2.....	47
Tabela 10: Sequência dos <i>primers</i> para sequenciamento do plasmídeo pCIL2B1	47
Tabela 11: Reação para a transcrição reversa e controle negativo.....	50
Tabela 12: Sequência dos <i>primers</i> utilizados na RT-PCR	50
Tabela 13: Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígenos
BHV-1	Vírus da Herpes Bovina tipo 1
BPV	Papilomavírus Bovino
BRSV	Vírus Sincicial Respiratório Bovino
BVDV	Vírus da Diarréia Bovina
CMV	Citomegalovírus
COPV	Papilomavírus oral canino
CRPV	Papilomavírus do coelho cottontail
CTL	Linfócitos T Citotóxicos
DCs	Células dendríticas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO600	Densidade ótica a 600 nm
E	Gene que codifica proteína Early ou imediata
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid ou ácido etilenodiamino tetra-acético
G	Glicina
GI	Gastrointestinal
HC	Cadeia pesada
HEK-293	Human Embryonic Kidney Cell (Célula Embrionária de rim humano)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus humano
IFN	Interferon
IM	Injeção intramuscular
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Gene que codifica proteína Late ou tardia
LC	Células de Langerhans
LCR	Região longa de controle
MHC I	Complexo maior de histocompatibilidade de classe I
mRNA	RNA mensageiro
ORF	Open reading frame ou quadro aberto de leitura

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PV	Papilomavírus
Q	Glutamina
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
TAP	Transportador associado ao peptídeo
TCD4+	Célula T auxiliar
TCD8+	Célula T citotóxica
tRNA	RNA transportador

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Geral.....	3
2.2 Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Papilomatose bovina.....	8
3.2 L2 como estratégia profilática para papilomatose bovina.....	19
3.3 Vacina de DNA como estratégia de imunização	23
4. MATERIAIS E MÉTODO.....	35
4.1 Amplificação do gene L2	35
4.2 Clonagem do gene L2 no vetor de expressão pCIneo	36
4.3 Sequenciamento de DNA	40
4.4 Transfecção da construção pCIL2B1	41
4.4.1 Cultivo e transfecção <i>in vitro</i> de células HEK 293	41
4.4.1.1 Avaliação da eficiência de expressão utilizando o gene reporter β -galactosidase	41
4.5 Análise da expressão da proteína L2.....	42
4.5.1 Extração de RNA total das células 293 transfectadas.....	42
4.5.2 Síntese de cDNA e RT-PCR	43
4.5.3 Avaliação da produção da proteína L2 por SDS-PAGE	44
4.5.4 Avaliação da produção da proteína L2 através de Western blot	44
5. RESULTADOS.....	46
5.1 Artigo: Desenvolvimento de uma estratégia baseada em vacina de DNA contra infecção por <i>Papilomavírus bovino</i> , incluindo os gene E5 ou L2	46

5.2 Amplificação do gene L2	46
5.3 Clonagem do gene L2 no vetor de expressão pCIneo	47
5.4 Análise da expressão da proteína L2	50
5.4.1 Avaliação da eficiência de expressão utilizando o gene reporter β -galactosidase	50
5.4.2. Análise da transcrição do gene L2	51
5.4.3 Avaliação da produção da proteína L2 por SDS-PAGE	53
5.4.4 Avaliação da produção da proteína L2 através de Western blot	54
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÃO	61
8. REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE	77
ANEXO.....	78

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil é dono do segundo maior rebanho bovino do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças, Pernambuco detinha quase 2 milhões e 300 mil cabeças em 2009. Além disso, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países.

O rebanho bovino brasileiro proporciona o desenvolvimento de dois segmentos lucrativos. As cadeias produtivas da carne e leite. O valor bruto da produção desses dois segmentos, estimado em R\$ 67 bilhões, aliado a presença da atividade em todos os estados brasileiros, evidenciam a importância econômica e social da bovinocultura em nosso país.

No entanto, algumas doenças vêm causando prejuízos consideráveis, principalmente naqueles animais de importância econômica. Entre elas está a papilomatose, que é uma doença infectocontagiosa, que acomete muitas espécies de aves, mamíferos, incluindo o homem. A doença é muitas vezes ignorada pelos criadores e profissionais, por não ser de notificação compulsória, mas nos últimos tempos tem-se verificado uma maior preocupação em relação a ela, provavelmente devido à descoberta da sua relação com determinados tipos de câncer e outras doenças.

A papilomatose cutânea bovina é uma enfermidade crônica, de caráter tumoral benigna, de natureza fibroepitelial e origem viral, caracterizando-se por apresentar tumores que se localizam na pele e mucosa. É uma doença de caráter cosmopolita conhecida, vulgarmente, por verruga ou figueira dos bovinos. É uma doença importante economicamente por causar desvalorização dos animais a serem comercializados, piorando a aparência e causando depreciação do couro dos animais afetados. Dependendo da intensidade das lesões, poderá ocorrer debilitação e alterações funcionais orgânicas podem ser ocasionadas pelos tumores. A presença das verrugas no úbere de vacas em lactação desvaloriza os animais e torna o úbere susceptível às infecções secundárias, resultando em mastites.

A grande maioria de tipos de PV possui a capacidade de permanecer em longos ciclos de latência. Estes vírus de DNA são estritamente espécie-específicos e, mesmo em condições experimentais, não infectam outro hospedeiro que não o

seu natural. O papilomavírus bovino (BPV) é caracterizado como o único caso reconhecido de infecção cruzada dentro da família Papillomaviridae, de BPVs 1 e 2 em cavalos e outros equídeos, resultando em uma lesão tumoral comum em equinos, o sarcóide equino, que pode levar ao sacrifício do animal.

Atualmente, 10 tipos de BPVs já foram descritos, sendo classificados de acordo com critérios histopatológicos, imunológicos e moleculares. Os BPVs 1 e 2 estão relacionados com o câncer de bexiga urinária e o BPV 4 com câncer do trato digestório superior.

Para o controle da infecção causada pelo papilomavírus e a diminuição dos problemas econômicos causados pela mesma, têm-se optado frequentemente pela autovacinação. Esta vacinação é feita com extrato bruto de verrugas tratadas para inativação do vírus, uma vez que não existem vacinas comerciais disponíveis, sejam preventivas ou terapêuticas.

Vários estudos testaram a eficácia de vacinas contra infecções por PV baseados nos produtos dos genes estruturais e não-estruturais do vírus. Alguns estudos vêm demonstrando que L2 é capaz de prevenir uma gama de genótipos clinicamente importantes de HPV. Tornando o BPV um modelo experimental ideal para o estudo do papilomavírus humano (HPV), a partir do qual se investiga a interação dos papilomavírus com seu hospedeiro natural e com co-fatores ambientais. O primeiro estudo com a vacinação contra diferentes tipos de BPV sugeriu que a imunidade para o papilomavírus é tipo-específica.

Dessa forma, a construção de um vetor contendo o gene L2 do papilomavírus bovino tipo 1 visa o futuro desenvolvimento de uma estratégia vacinal baseada em imunização genética, tornando-a um modelo experimental viável e de baixo custo, abrangendo interesses econômicos.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Construir um vetor gênico baseado no plasmídio pCI-neo usando o gene L2 de BPV 1, e avaliar a expressão de L2 em células de mamíferos.

2.2 Específicos

1. Obter o gene L2 de BPV 1 pela técnica de PCR usando primers específicos;
2. Subclonar o gene L2 no vetor de expressão (pCI) em células de mamíferos originando a construção pCIL2B1;
3. Obter células HEK 293 (Human Embryonic Kidney Cell - Célula Embrionária de rim humano) transfectadas com construção vacinal pCIL2B1;
4. Analisar expressão do gene L2 nas células HEK 293 transfectadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os papilomavírus constituem um grande grupo de vírus epiteliotróficos com genoma de DNA não envelopados, que infectam a pele e mucosa de várias espécies de vertebrados, inclusive o homem, sendo altamente específicos, não apenas para seus respectivos hospedeiros, mas também em relação aos sítios anatômicos onde causam infecção em cada um deles (MEYERS, MAYER & OZBUN, 1997). Inclui-se nesse grupo o vírus do papiloma bovino com 10 diferentes tipos, classificados de acordo com as propriedades biológicas e organização do genoma.

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

Esse patógeno atinge até 30% do rebanho, favorecendo a ocorrência de novos casos em animais sadios, determinando com isto a perpetuação do processo mórbido na propriedade. Há relatos na literatura de casos onde a enfermidade atinge até 75% do rebanho (ROSENBERGER, 1989; SMITH, 1994; RADOSTITS *et al.*, 2000). A espécie mais acometida é a bovina, apresentando infecção cutânea, orogenital e orofaríngea. Ocorre em outras espécies e o reservatório é o próprio animal doente, sendo seu curso muito prolongado (SMITH, 1994; MORTER & HORSTMAN, 1999).

Os prejuízos econômicos que a papilomatose bovina acarreta são a cegueira, o desenvolvimento retardado, a desvalorização do couro do animal e, conseqüentemente, a diminuição da produtividade. Ocorre ainda uma sensível depreciação do valor do animal, em função da dificuldade na comercialização do mesmo e de problemas relacionados com a fertilidade, principalmente quando a localização do papiloma é observada na genitália. Outro problema decorrente da doença é o surgimento de papilomas no úbere, o que dificulta a ordenha e pode determinar quadro de mastite. Uma das conseqüências imediatas do processo é o estabelecimento de miíases onde o papiloma localiza-se, além de servir de porta de entrada para outras infecções (ROSENBERGER, 1989; RAI *et al.*, 1991; RADOSTITS *et al.*, 2000).

Os BPVs possuem genomas com aproximadamente 8000 pares de base, são pequenos vírus oncogênico, não-envelopado, com morfologia icosaédrica e diâmetro de 55–60nm (Figura 1). O capsídeo apresenta 72 capsômeros, formado pelos pentâmeros de 360 cópias de uma proteína designada L1, além de 12 cópias de outra proteína, denominada L2, (BAKER *et al.*, 1991; MODIS *et al.*, 2002) que atravessa o capsídeo e liga-se ao genoma viral, sendo este constituído por DNA dupla fita circular (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

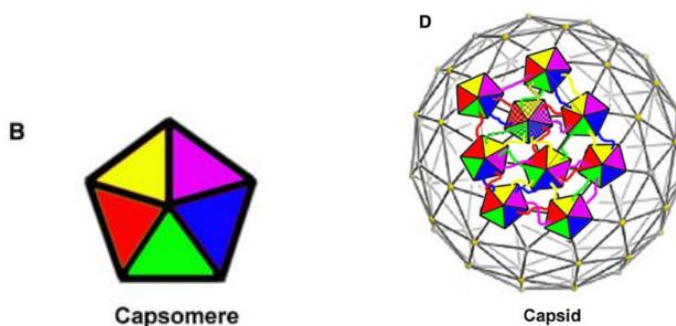


Figura 1. Capsômero e capsídeo não-envelopado (PEREIRA *et al.*, 2009).

O genoma do papilomavírus contém dois segmentos principais, cada um constituído por uma série de janelas de leitura para proteínas (ORFs) que codificam as proteínas virais, e uma longa região de controle (LCR), como podemos observar na figura 2. São elas chamadas de ORFs (*Open Reading Frames*) não-estruturais ou precoces (E) e estruturais ou tardias (L), de acordo com o período de expressão.

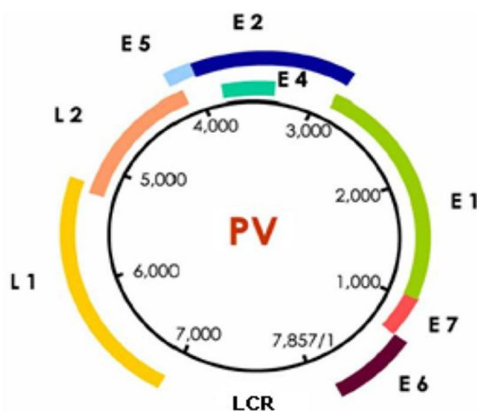


Figura 2. Mapa genômico característico dos Papilomavírus (PV)

A região precoce (Early) representa 45% do genoma e é formada por 6 genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) envolvidos em diferentes momentos do ciclo de replicação, mas geralmente se expressam no começo do processo replicativo. O gene E1 codifica uma proteína que se liga especificamente a região URR e possui uma atividade helicase dependente de ATP, responsável pela fase inicial de replicação do DNA viral (SEO *et al.*, 1997; YANG *et al.*, 1991) e interage com a DNA polimerase sendo essencial para a replicação do DNA viral (ZUR HAUSEN, 1994). O gene E2 codifica duas ou, provavelmente, três proteínas virais diferentes, que se ligam ao DNA viral e atuam como fatores de transcrição. Essas proteínas podem apresentar função de trans-ativação ou repressão dos genes virais, dependendo de como os seus sítios ligantes interagem com a região URR (McBRIDE, ROMANCZUK & HOWLEY, 1991). A perda da expressão de E2 está correlacionada com o aumento da proliferação celular induzido por E6 e E7 (HEDGE, 2002).

O gene E4 codifica uma proteína cujo papel na biossíntese dos vírus, ainda não foi determinado. Ela não é requerida para a transformação ou persistência episomal do DNA viral. Essa proteína é encontrada principalmente nas células das camadas mais diferenciadas do epitélio infectado, podendo ter papel na criação de condições favoráveis para maturação das partículas virais (ZUR HAUSEN; 1996; ZUR HAUSEN; 1999).

O gene E5 codifica uma proteína envolvida com a estimulação do crescimento e transformação da célula, e forma complexos com uma variedade de outras proteínas trans-membrana (CONRAD *et al.*, 1993), possui importante papel transformante na célula infectada (ZUR HAUSEN, 1996).

A proteína E6 de BPV é um ativador transcricional, que interage e inibe o coativador de transcrição CBP/p300 e, também inibe a função do supressor tumoral p53 (ZIMMERMAN *et al.*, 2000), em HPVs de alto risco E6 está distribuída tanto no núcleo quanto no citoplasma das células infectadas podendo interagir com aproximadamente 12 diferentes tipos de proteínas celulares, além disso, podem ativar a transcrição da subunidade catalítica da enzima telomerase, impedindo que as células entrem em senescência tornando-se imortais (ZUR HAUSEN, 2002).

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). Em HPV, E7 também codifica outra oncoproteína viral também importante na imortalização celular e consequentemente no papel carcinogênico do HPV.

A região tardia (Late) representa 40% do genoma viral e é composta pelos genes L1 e L2, os quais codificam proteínas estruturais que formam o capsídeo viral (LONGWORTH & LAIMINS, 2004). O gene L1, é constituído por pouco mais de 1500 pares de bases e possui um peso molecular aparente de 54-58 kDa. L1 é o principal constituinte do capsídeo viral e é imunogênica. O gene L2 codifica a proteína secundária do capsídeo viral, tem peso molecular aparente de 72 kDa (BUCK *et al.*, 2005). L2 também é imunogênica e possui epítomos que induzem a produção de anticorpos reativos grupo-específico (ROSE, 1994).

As proteínas L1 e L2 são expressas no núcleo dos queratinócitos diferenciados. Durante a morfogênese do vírion, L2 liga-se ao DNA viral, favorecendo a sua encapsidação, já L1 medeia a ligação do vírus aos receptores da superfície celular. No entanto, é provável que L2 também apresente um papel importante durante a infecção. Ambas as proteínas codificam epítomos neutralizantes e, no caso de L2 de BPV-2, epítomos de rejeição tumoral (CAMPO, 2006; BORZACCHIELLO & ROPERTO, 2008).

Entre os segmentos L e E existe a longa região de controle (LCR-*long control region* ou URR-upstream regulatory region) que representa 15% do genoma, contendo elementos regulatórios. A LCR É uma área não-codificante do genoma viral, de aproximadamente 500-1000 nucleotídeos, dependendo do tipo do papilomavírus, situada entre o terminal 3' da ORF tardia e o terminal 5' da ORF precoce. Essa região possui inúmeros locais de ligações para os repressores e ativadores da transcrição, além da origem de replicação (NICHOLLS & STANLEY, 2000; MUNGER & HOWLEY, 2002; BORZACCHIELLO & ROPERTO, 2008). A LCR dos BPV-1, BPV-2 e BPV-5 contém 12 sítios de ligação à E2, enquanto que nos tipos 3, 4 e 6, são reconhecidos apenas quatro sítios de ligação à E2. A proteína E2 é a reguladora da transcrição viral, e sua ligação à LCR pode ativar ou reprimir a transcrição dos genes virais (BORZACCHIELLO & ROPERTO, 2008). No entanto, a LCR de BPV-4 possui múltiplos elementos regulatórios positivos e negativos capazes de agir independentemente da presença de E2 (Jackson & Campo, 1995).

Embora esta seja a organização convencionada para o genoma viral dos PVs, há alguma variação quanto a presença e ausência de ORFs, a depender do tipo viral considerado. Por exemplo, 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).

3.1 Papilomatose Bovina

Os vírus do papiloma bovino (BPV) têm sido associados a diversas formas de câncer. Dada a intensa disseminação da papilomatose nos rebanhos, novas pesquisas com auxílio de metodologias moleculares podem contribuir com resultados mais eficazes contra a papilomatose bovina. Diminuindo o impacto econômico, visto que o Brasil é um dos grandes produtores de gado, contudo, novas metodologias poderiam ser utilizadas como parâmetro para o desenvolvimento de tratamentos e/ou medidas preventivas para o HPV, visto que o BPV é considerado um bom modelo experimental.

Segundo Campo (1998), as lesões mais comuns associadas à infecção por BPV em bovinos são: papilomas na pele (BPV 1, 2 e 3), papilomas e câncer no trato gastrointestinal superior (BPV4), papilomas nos tetos e úbere (BPV 1, 5 e 6), papilomas no pênis (BPV 1) e câncer na bexiga urinária (BPV 1 e 2) (figuras 3 e 4). Os cânceres do trato gastrointestinal superior e da bexiga urinária desenvolvem-se como resultado da interação entre o vírus, carcinógenos químicos e imunossupressores presentes na samambaia ingerida pelo animal (CAMPO, 1997a). Como já mencionado, os tetos e úberes estão sujeitas à infecção por três diferentes tipos de BPV, mas quando causada especialmente pelo BPV 6, a doença deixa de ser apenas um problema de saúde animal e passa a ter grandes consequências econômicas devido à peculiar propagação das lesões ao redor do tumor primário provocado por esse tipo de BPV. Esta expansão é clinicamente significativa, uma vez que as vacas com papilomas nos tetos não podem ser ordenhadas e ficam impossibilitadas de amamentar os bezerros. Além disso, frequentemente papilomas pedunculados são arrancados, provocando processos infecciosos (CAMPO, 1998; CAMPO, 2006). A papilomatose no pênis interfere na função reprodutiva dos touros

reprodutores e estes animais são sacrificados. Ocasionalmente, rebanhos inteiros são sacrificados caso a papilomatose não regrida (CAMPO, 2002).

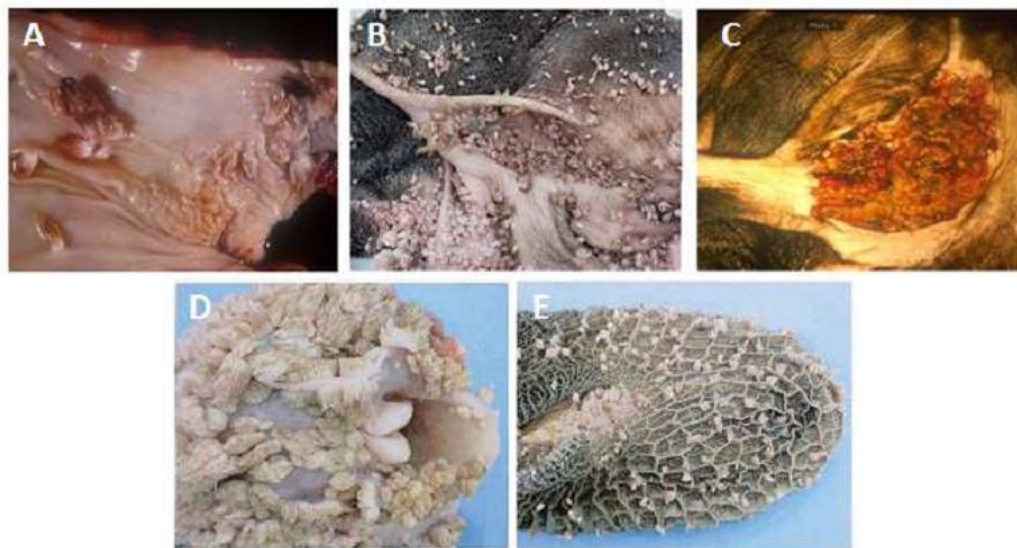


Figura 3. Lesões em bovinos associadas à infecção por BPVs 1, 2, 3 e 4: (A) Papiloma esofágico; (B) Extensa papilomatose no rúmen; (C) Carcinoma de célula escamosa do rúmen; (D e E) Extensa papilomatose na faringe e no retículo, respectivamente. Fonte: adaptada de Campo (2002) e Campo (2006).

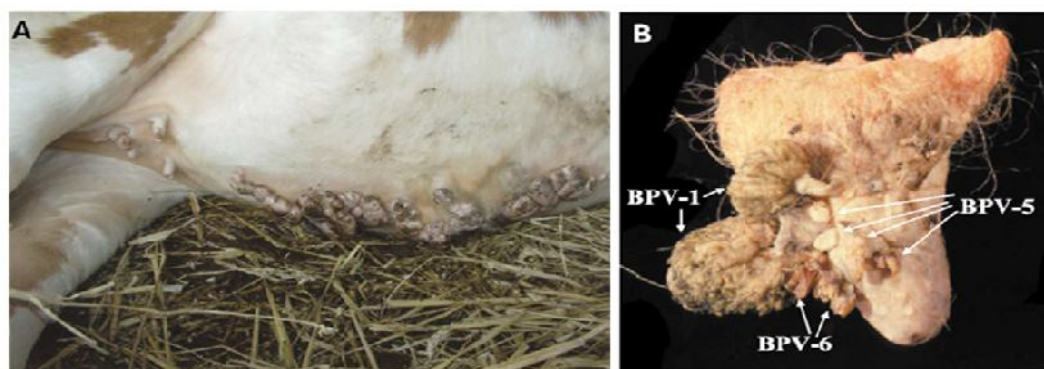


Figura 4. Lesões em bovinos associadas à infecção por BPVs 1, 5 e 6: (A) Pequenos tumores nos tetos e múltiplos tumores globosos de diferentes tamanhos localizados ao longo da linha alba; (B) Papilomas nos tetos. É possível visualizar tanto frondosos fibropapilomas causados por BPV 1 e 5 quanto fibropapilomas ovais causados pela infecção de BPV 6. Fonte: adaptada de JELÍNEK & TACHEZY (2005) e CAMPO (2002).

Até pouco tempo atrás, os BPVs estavam classificados em 6 tipos bem caracterizados. No entanto, essa classificação sofreu modificações, atualmente, a nomenclatura leva em consideração as propriedades biológicas e organização do genoma, os epiteliotrópicos (BPVs 3, 4, 6, 9 e 10) são definidos como gênero

Xipapilomavírus, os BPVs 1 e 2 como Delta-papilomavírus e os BPV 5 e 8 são os únicos membros do Epsilon-papilomavírus (figura 5) (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

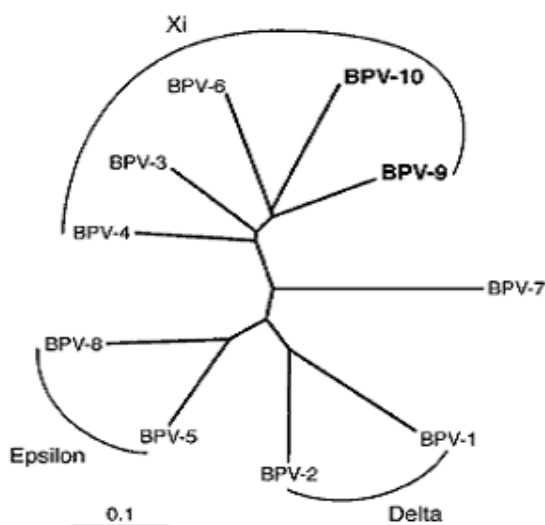


Figura 5. Árvore filogenética apresentando a disposição dos grupos de papilomavírus bovinos. Fonte: Hatama *et al* (2008).

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).

As lesões hiperplásicas produzidas pelos papilomavírus, definidas como verrugas, papilomas ou condilomas, são geralmente lesões benignas (Munoz, 2000). No entanto, o gado pode apresentar processos neoplásicos derivados da malignização de papilomas pré-existent, devido à ação sinérgica de co-fatores ambientais (CAMPO, 2002; LEAL *et al.*, 2003). No caso dos tumores de bexiga em bovinos, eles estão comumente associados com uma síndrome conhecida como hematúria enzoótica (HE), a qual é causada pela ingestão prolongada de brotos de samambaia (CONFER & PANCIERA, 2001).

A hematúria enzoótica bovina (HEB) é uma das formas clínicas da intoxicação crônica por samambaia (*Pteridium aquilinum*), caracterizada por neoplasmas na bexiga com consequente hematúria, anemia, emagrecimento progressivo e morte. Essa doença afeta bovinos de ambos os sexos com idades superiores a dois anos. A HEB tem sido relatada no Brasil e em outras partes do mundo, sendo responsável

por perdas econômicas significativas onde *P. aquilinum* é abundante (ALBUQUERQUE, 2006).

O consumo de samambaia foi implicado na etiologia da HEB devido à forte associação entre a presença dessa planta nos campos e a ocorrência da doença (DÖBEREINER *et al.*, 1967; ALBUQUERQUE *et al.*, 2006; JARRETT *et al.*, 1978). A HEB foi reproduzida experimentalmente em bovinos pela administração de samambaia. *P. aquilinum* possui vários princípios carcinogênicos, mutagênicos e imunossupressores (CAMPO *et al.*, 1992). Dentre eles, encontram-se o ptaquilosídeo norsesquiterpeno e a quercetina (CAMPO, 1997). A co-carcinogenicidade entre os compostos químicos da samambaia e a infecção com o papilomavírus bovino tipo 2 (BPV-2) também tem sido implicada na etiologia da HEB (CAMPO *et al.*, 1992; CAMPO, 2002; WOSIACKI *et al.*, 2005).

Em um estudo realizado em bovinos na Itália, envolvendo amostras de tumores de bexiga coletadas em abatedouro, verificou-se que 77% delas eram positivas para BPV-2 (BORZACCHIELLO *et al.*, 2003). Estes resultados fortalecem a hipótese que a etiopatogenicidade destes tumores está relacionada ao BPV-2.

O DNA do BPV-2 já foi detectado em amostras de sangue total (STOCCO DOS SANTOS *et al.*, 1998; FREITAS *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2007), em tumores de bexiga de animais exibindo sinais clínicos de HE, assim como em tecido do trato reprodutivo e em gametas (CARVALHO *et al.* 2003, WOSIACKI *et al.* 2005, 2006; Freitas *et al.*, 2007). O quadro anatomopatológico da HE caracteriza-se por lesões hemorrágicas e hiperplásicas da mucosa vesical que, com frequência, evoluem para neoplasias (OLSON *et al.*, 1959; POLACK, 1990; CAMPO *et al.*, 1992; DURÃO *et al.*, 1995). As primeiras manifestações clínicas da HE ocorrem em animais adultos, após um longo período de exposição à samambaia. A HE pode ainda ocorrer em associação com neoplasias do trato digestório. Esta forma clínica está também etiologicamente associada à infecção pelo BPV-2 (RAJENDRAN *et al.*, 1983; HOPKINS, 1986; DURÃO *et al.*, 1995).

A presença do BPV-2 em papilomas e carcinomas na bexiga de bovinos, associados à HE, foi inicialmente sugerida com base na detecção de corpúsculos de inclusão, característicos do vírus, em células tumorais. Posteriormente foi relatado que tumores de bexiga induzem lesões similares quando injetados em animais saudáveis e que animais com carcinoma do trato digestório apresentam alta prevalência de papilomas na região tumoral. No entanto, as toxinas da samambaia

também são capazes de produzir tumores em animais de laboratório livres da infecção pelo BPV-2, e este, isoladamente, foi capaz de produzir neoplasias na bexiga de bezerros que não tinham acesso à samambaia (HOPKINS *et al.* 1990). Resultados de vários experimentos confirmaram que tanto o vírus quanto a samambaia estão envolvidos na carcinogênese da bexiga (JARRETT, 1978; PACHAURI *et al.*, 1981; HOPKINS, 1986; MOURA *et al.*, 1988; POLACK, 1990, CAMPO *et al.*, 1992; SANTOS *et al.*, 1998). Reddy e Fialkow (1983) descreveram que, diferentemente das induções por carcinógenos isolados, o BPV induz a iniciação e a promoção dos tumores em conjunto com compostos da samambaia. A rota da infecção do BPV-2 para a bexiga ainda não é conhecida, mas já foi comprovado que o BPV-2 pode ser transmitido de forma vertical (STOCCO DOS SANTOS *et al.*, 1998).

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

O sarcóide equino é o tumor da 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 sarcóide pode ser definido como tumor fibroblástico benigno localmente agressivo da pele equina (NASIR & CAMPO, 2008) e pode ocorrer como lesões únicas ou múltiplas em diferentes formas, desde pequenas lesões parecidas com verrugas até grandes úlceras fibrosas. As lesões podem ocorrer em todo o corpo, mas existem sítios de predisposição em especial na região paragenital, no tórax-abdome e na cabeça e, frequentemente, ocorrem em locais de lesão prévia e cicatrizes (TORRONTGUI & 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 (proteínas E), incluindo a principal oncoproteína E5, são consistentemente expressas, fornecendo evidências claras que a presença do DNA viral não é acidental; as proteínas tardias (proteínas L) são ocasionalmente detectadas, mas não se observa partículas virais, sugerindo que a infecção é abortiva numa fase tardia (CHAMBERS *et al.*, 2003; NASIR & CAMPO, 2008).

Já se disse que os papilomas infectam preferencialmente o epitélio cutâneo e mucoso. Mas, para compreender o seu ciclo de vida, é necessário ter presente a constituição deste tecido, assim como a evolução do mesmo.

O tecido epitelial que reveste a pele e as mucosas é pluriestratificado. Dos vários estratos sobrepostos existentes, o que é mais inferior designa-se por estrato basal. A medida que as novas células são formadas, vão migrando para cima e diferenciam-se progressivamente. Estas células em diferenciação são denominadas por queratinócitos. O ciclo de infecção do papilomavírus está intrinsecamente relacionado aos estágios de diferenciação das células epiteliais do hospedeiro (O'BRIEN & CAMPO, 2002), como mostra a figura 6.

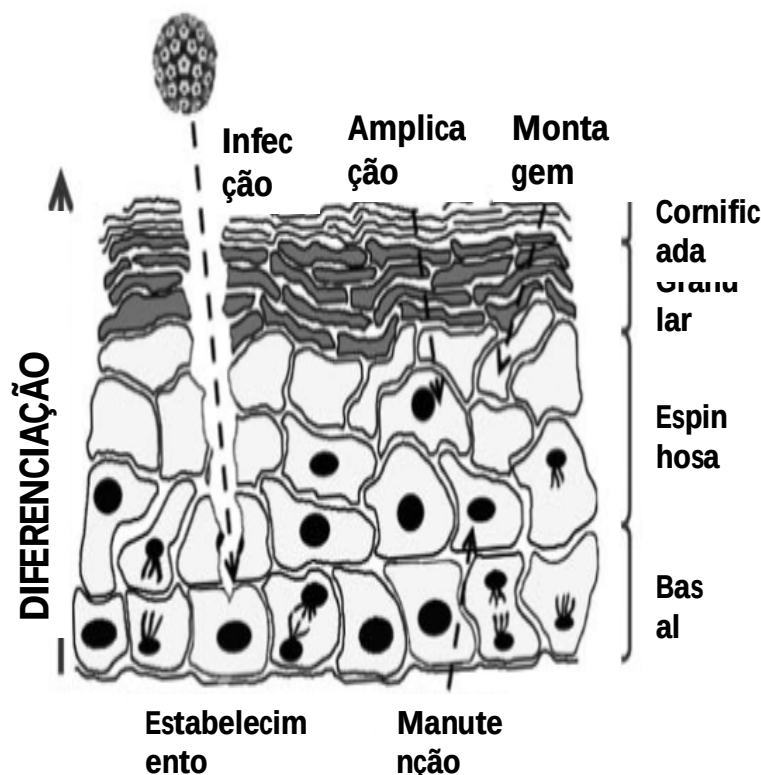


Figura 6. Ciclo de infecção do PV. Entrada do vírus no tecido epitelial através de microtrauma e estabelecimento da infecção na camada basal (CONWAY e MEYERS, 2009).

A dificuldade de mimetizar a diferenciação do epitélio estratificado em culturas de células tem sido um desafio para o estudo do ciclo de vida desses vírus. Dessa forma, muito do que se sabe sobre a morfogênese deriva do estudo de versões recombinantes das proteínas estruturais L1 e L2 (BUCK *et al.*, 2005). Além disso, a pesquisa de vacinas para o papilomavírus é dificultada pela sua incapacidade de

replicação *in vitro* em culturas celulares e pela sua dificuldade de adaptação em culturas de tecidos. (WOSIACKI *et al.*, 2002).

A replicação viral ocorre nas camadas basais do epitélio escamoso estratificado da pele ou de membranas mucosas e, provavelmente, os vírus têm acesso às células do nível inferior através de lesão e/ou abrasão. O vírus atinge o núcleo das células basais através de microlacerações, sendo que os primeiros sinais de transcrição do genoma viral aparecem cerca de 4 semanas após a infecção (BUCK *et al.*, 2005).

Uma vez infectadas, as células epiteliais são transformadas pelo PV para a indução da hiperplasia e hipertrofia destas. O vírus infecta os queratinócitos basais expressando os genes virais precoces nas camadas basais e suprabasal do epitélio e replica seu genoma durante a diferenciação da camada espinhosa e granular. Dentro das camadas epidérmicas basal e primeira suprabasal, o DNA viral é replicado para um número de 50 a 100 cópias por célula (BEDELL *et al.* 1991, CAMPO, 1997b). 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 (figura 7). Os vírions são formados e finalmente liberados com a descamação da camada queratinizada (O'BRIEN & CAMPO, 2002). À medida que os vírus amadurecem e as partículas virais se agrupam, eles migram em direção à superfície, consequentemente, vírus completos são encontrados apenas nas camadas epiteliais superiores. Este gradiente de replicação e diferenciação do epitélio basal para o epitélio apical tem implicações significativas para a detecção e o tratamento das infecções relacionadas ao PV (HOWLEY & LOWY, 2001), uma vez que é difícil a reprodução fiel desse ambiente celular em cultivo celular.

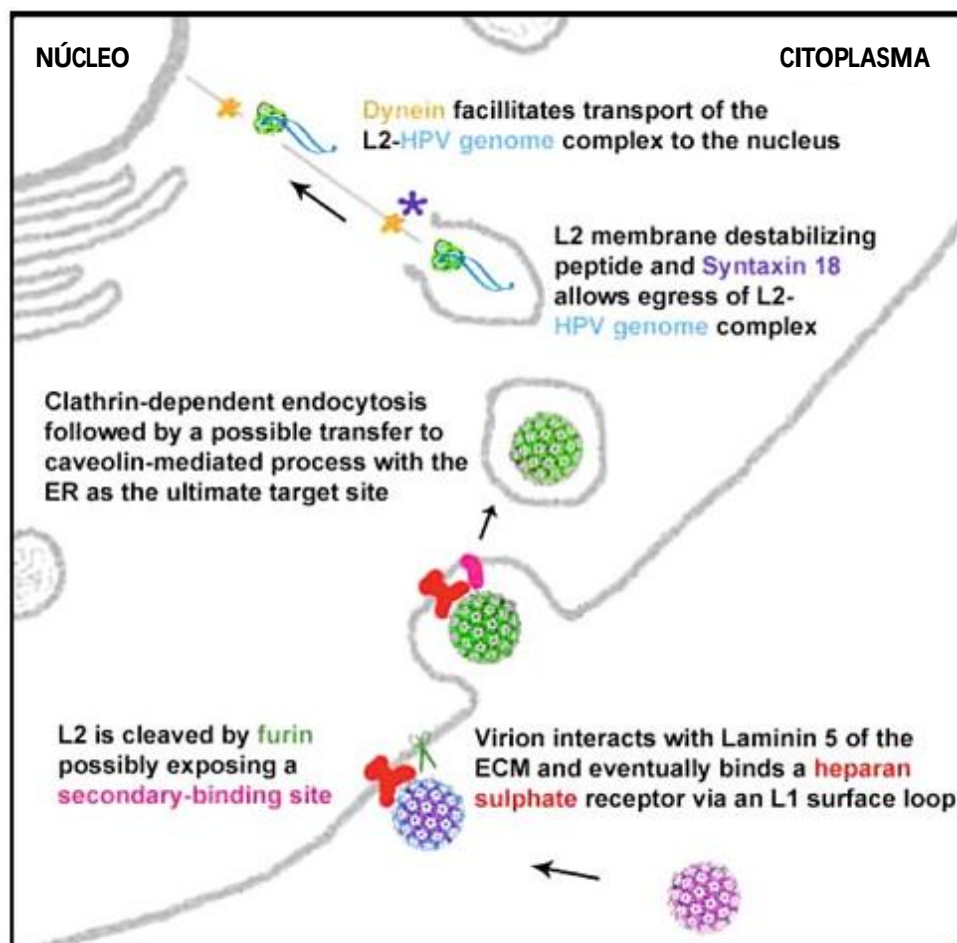


Figura 7. Modelo de entrada do HPV na célula. Este é um diagrama simplificado explicar o complexo processo de entrada viral. Receptores na membrana celular e várias proteínas celulares são indicados por símbolos com cores correspondentes. As mudanças na cor do vírion tem sido usado para indicar uma mudança conformacional ocorrendo dentro da estrutura do capsídeo a ligação e clivagem, (PEREIRA *et al.*, 2009).

Rosenberger (1989) descreveu que a extensão e duração do crescimento dos papilomas estão relacionadas à idade, à receptividade genética, ao manejo inadequado e à imunodeficiência. O problema pode atingir até 75% de um rebanho e pela existência de novos animais susceptíveis a enzootia podem durar anos.

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. O DNA de BPV está presente em forma episomal nos linfócitos circulantes de bovinos, enquanto o papilomavírus humano encontra-se integrado ao genoma do hospedeiro nas linhagens celulares do carcinoma do colo uterino, porém encontra-se na forma episomal extracromossômico nas lesões benignas (CHOO *et al.*, 1987). Esse achado sugere que, para o HPV, a inserção do genoma viral no genoma da célula hospedeira é, pelo menos, uma das maneiras de desencadear o processo maligno.

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).

O ciclo de vida dos PVs evoluíram de maneira a minimizar sua exposição ao sistema imune do hospedeiro. Entretanto, muitos aspectos da biologia do papilomavírus apontam para a importância da resposta imune na determinação do curso da infecção.

Estudos epidemiológicos sugerem fortemente que a resposta imune a infecções por papilomavírus seguem um padrão semelhante. A falha do sistema imune em reconhecer tanto o vírus infectante como a progênie viral, é devido ao fato do ciclo de vida do vírus ser restrito ao epitélio e não existir contato com o sistema imune do hospedeiro. Animais podem carregar tumores grandes, produzindo vírus ativamente em grandes quantidades, mas não respondem facilmente aos antígenos virais durante o curso da infecção e anticorpos anti-BPV são raramente detectados. (O'BRIEN & CAMPO, 2002; TINDLE, 2002).

Fortes evidências indicam que o processo de regressão dos papilomas seja mediado por uma resposta imune celular, enquanto que a proteção contra a infecção seja devida a anticorpos neutralizantes (CAMPO, 1997b). Animais com tumores ulcerados e hemorrágicos têm níveis altos de anticorpos anti-BPV e uma boa

resposta humoral pode ser obtida após a inoculação intramuscular de vírus purificados ou proteínas virais, confirmando que apenas quando o papiloma é danificado ou via imunização, antígenos virais entram em contato com células imunes. Em estágios tardios de infecção, pode-se observar uma resposta celular e humoral fraca, contra proteínas do capsídio e/ou contra a proteína transformante E7, a qual parece está associada com a rejeição do papiloma (CAMPO, 1998).

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

O MHC I é responsável pela apresentação de peptídeos antigênicos a células T efectoras, e desempenha um papel crítico na vigilância imune. O complexo consiste de cadeia pesada (HC ou *Heavy Chain*), β 2-microglobulina e peptídeo, (ASHRAFI *et al.*, 2002). Todos estes elementos são essenciais para formação e estabilidade do complexo. A degradação proteolítica das proteínas virais gera um espectro de peptídeos que são carregados pela a cadeia pesada do MHC I no reticulo endoplasmático, onde a microglobulina β 2 e chaperonas, como TAP (transportador associado com peptídeo), são importantes para formação do complexo (CRESSWELL *et al.*, 1999). O complexo MHC I é glicosilado e transportado do reticulo endoplasmático pelo aparato de Golgi para a membrana plasmática para ser apresentado aos linfócitos T citotóxico. Portanto, MHC I desempenha um papel crítico na vigilância imune (GROMME *et al.*, 1999).

A *down-regulation* do MHC I é realizada pela ação da proteína E5 do BPV, e a regulação ocorre em vários níveis: a transcrição do gene da cadeia pesada do MHC I é reduzida, o peptídeo da HC do MHC I é degradado e o complexo MHC I é

sequestrado nas cisternas do Golgi e é irreversivelmente impedido de chegar à superfície celular (MARCHETTI *et al.*, 2002; ARAIBI *et al.*, 2006). A retenção do MHC I na cisterna do Golgi é o resultado de pelo menos dois eventos. Em primeiro lugar, à alcalinização induzida por E5 do aparelho de Golgi e, em segundo lugar, por uma interação física direta entre E5 e HC do MHC I (ARAIBI *et al.*, 2006). A inibição da expressão do MHC I por E5 também foi observada em papilomas induzidos por BPV, corroborando os experimentos realizados *in vitro* (ARAIBI *et al.*, 2004).

Apesar do capsídeo viral estar inacessível às células do sistema imune, as células infectadas nas camadas internas do epitélio, que estão expressando as proteínas virais precoces (E5, E6 e E7), poderiam estar sujeitas à vigilância das células do sistema imune, incluindo os linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APC). Embora estas proteínas virais sejam imunogênicas quando administradas como vacinas (TINDLE, 1996), os antígenos virais não são eficientemente apresentados ao sistema imune, nem eles devem ser expressos em níveis detectáveis para o sistema imune durante a infecção natural. Isso acarretará uma ativação fraca das células T, resultando em uma ignorância imunológica e/ou tolerância às células. A ausência das moléculas de MHC I na superfície das células epiteliais previne a apresentação dos peptídeos virais para as células T efectoras, evitando a morte das células infectadas pelas CTLs. Além disso, outro mecanismo para evitar a resposta imune é a interferência na rota do interferon (IFN), o que pode favorecer o estabelecimento do vírus no início da infecção (O'BRIEN & CAMPO, 2002).

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

Mediadores inflamatórios são liberados como resultado de um dano ao tecido produzido por algum patógeno, por exemplo, podendo assim, ativar as APCs, como as células dendríticas (células de Langerhans (LC) na pele), permitindo que estas células possam eficientemente processar e apresentar os antígenos estranhos para as CTL. Como o ciclo de infecção dos PV é não-lítico e, portanto não provoca nenhum sinal pró-inflamatório que ative células dendríticas (DC) e induza sua

migração para o local da infecção. A natureza não-lítica da infecção por papilomavírus limita a produção de antígenos que são processados e apresentados ao sistema imune adaptativo (O'BRIEN & CAMPO, 2002; KANODIA *et al.*, 2007).

3.2 L2 como Estratégia Profilática para Papilomatose Bovina

Apesar de existirem no mercado alguns tratamentos a disposição, a grande maioria revelou-se insatisfatória quando testada a campo, o que leva o produtor a descartar, precocemente, animais de alto valor zootécnico, justificando plenamente a busca de novos protocolos de tratamento. Na verdade a doença está amplamente difundida nos rebanhos bovinos brasileiros e o número de casos que realmente ocorre é muito mais elevado, do que o descrito na literatura. Com isso, o desenvolvimento de vacinas para prevenir infecções pelo PV tem se tornado uma questão fundamental. Particularmente para o BPV, a produção de uma vacina eficiente, segura e de baixo custo pode conduzir a uma grande redução nas taxas de incidência e mortalidade dos animais acometidos pela infecção desse vírus.

Nesse sentido, a proteína L2 vem sendo considerada uma forte candidata para vacinas de DNA contra papilomavírus. As proteínas recombinantes para o uso terapêutico produzidas em células de mamíferos representam 60% do mercado de biofármacos licenciados nos Estados Unidos e Europa (WALSH, 2003). Dentre as proteínas recombinantes, temos fatores plasmáticos sanguíneos, anticoagulantes, hormônios, fatores de crescimento, vacinas, anticorpos monoclonais entre outros produtos.

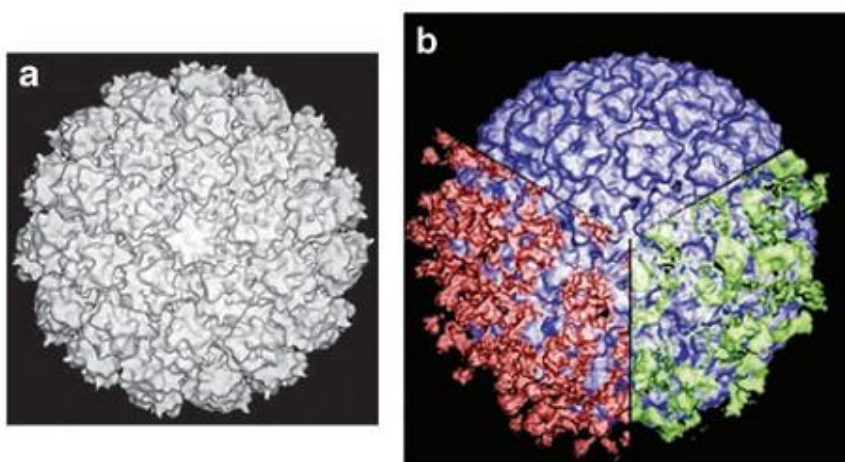
Segundo Campo, 1997, a proteína L2 além de ter função estrutural, provavelmente, L2, promove a ligação do vírus a receptores celulares, e participa de várias etapas durante a entrada do vírus em células hospedeiras (BUCK *et al.*, 2008). Apesar de L2 não ser necessário para a montagem do capsídeo, ela pode auxiliar na formação do capsídeo através da ligação com capsômeros de moléculas vizinhas, ou através da interação de um pentâmero de L1, ou por ambos os mecanismos (PEREIRA *et al.*, 2009).

A proteína L2 possui regiões mais conservadas entre os diferentes genótipos de papilomavírus humano. Estudos de imunização em modelo animal com a proteína L2 de HPV-16 demonstram neutralização cruzada com os HPV's dos tipos

6 e 18 (RODEN *et al.*, 2000). Um estudo clínico no qual humanos foram imunizados com o peptídeo de apenas 13 aminoácidos da proteína L2 de HPV-16 demonstrou neutralização cruzada com HPV-52 (KAWANA *et al.*, 2003). Kondo *et al.*, 2007, demonstraram que anticorpos neutralizantes contra peptídeos de L2 de HPV-16 foram capazes de neutralizar HPVs dos tipos 18, 31 e 58 em animais imunizados.

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

Embora os epítomos de neutralização imunodominantes estejam localizados na proteína L1, a proteína L2 por sua vez, é importante para o encapsidamento do genoma viral (RODEN *et al.*, 1996), pois durante a morfogênese o virion liga-se ao DNA favorecendo seu encapsidamento. L2 é uma proteína menor do capsídeo viral (figura 8), mas é extremamente necessária para infecção pelo papilomavírus, possivelmente por ser responsável pela ligação a um receptor secundário viral, facilitando a saída do endossomo e entrega do genoma viral para domínios apropriados dentro do núcleo (KARANAM *et al.*, 2009).



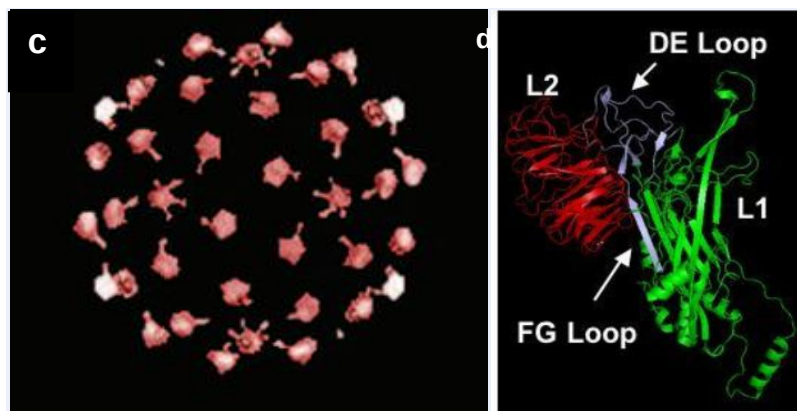


Figura 8. (A) Capsídeo icosaédrico do Papilomavírus bovino tipo 1, 72 capsômeros, cada um contendo cinco moléculas de L1 e mais uma molécula de L2. Visualiza-se 60 capsômeros (hexavalentes e pentavalentes), no centro da imagem capsômero pentavalente. L2 com maior densidade encontra-se no centro dos capsômeros. (B) Víron de BPV1 (azul) associados a anticorpos monoclonais neutralizantes (verde e vermelho), (KARANAM *et al*, 2009). (C) mostram L2 sozinho (vermelho) (BUCK *et al* 2008). (D) Predição da estrutura de L2 encaixada com L1 (LOWE *et al.*, 2008).

O gene L2 possui 469 aminoácidos (aa). Os primeiros 60 aa de L2 ficam dentro do capsídeo formado por L1 e ligam-se ao DNA viral, a sequência de 61 a 123 aa está exposta na superfície do vírus, alguns domínios de L2 estão expostos para possibilitar o reconhecimento imunológico por epítomos específicos, e a porção C-terminal localiza-se internamente. Em BPV a região de L2 exposta também seria capaz de interagir com os receptores celulares para facilitar a absorção de vírions (LIU *et al.*, 1999; LOWE, 2008). Segundo Lowe *et al.*, 2008, há 44 aminoácidos carboxi-terminal que facilitam a ligação de L2 com L1, esses 44 aminoácidos contêm resíduos importantes com prolinas conservadas. As histonas celulares condensam o genoma viral composto de DNA circular dupla fita em um minicromossomo, (figura 9) (FRAZER, 1996; HAN *et al.*, 1999; NICHOLLS & STANLEY, 2000; LOWE *et al*, 2008; MUNGER & HOWLEY, 2002).

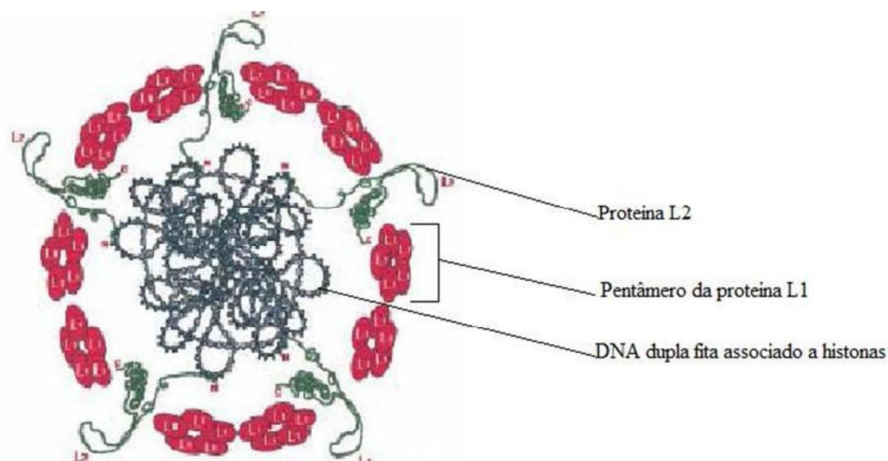


Figura 9. Ilustração da estrutura do capsídeo viral. A proteína L2 ligada ao DNA viral e atravessando o capsídeo; os monômeros da proteína L1 organizados em pentâmeros formando o capsídeo; o DNA dupla fita circular condensado por histonas (TRUS, *et al.* 1997).

Segundo Karanam 2009, estudos em modelos animais mostraram que L2 de BPV é um antígeno promissor para vacinação profilática, experimentos pioneiros em vacas e coelhos com polipeptídeos de L2 sem conter a região C-terminal mostrou-se eficiente contra papilomatose na pele e mucosa, nesse mesmo estudo sugeriu-se que polípetídeos contendo a região N-terminal conservada possibilita reação imunológica cruzada para HPV, o mesmo foi confirmado por Cambelas 2010, sugerindo que imunização com L2 induz a produção de anticorpos neutralizantes conferindo proteção cruzada mais ampla do que imunização com VLP de L1. Pesquisa clínica e pré-clínica tem confirmado que vacinas com L2 induzem um amplo espectro de anticorpos neutralizantes cruzado, mesmo possuindo proteína e polipeptídeos de L2 menos imunogênicos que VLP com L1, sugerindo que novas pesquisas com L2 devem continuar sendo feitas.

Recentemente, foi possível sintetizar VLPs (*virus-like particles* – partículas semelhantes a vírus) consistindo de L1/L2 e de uma das proteínas precoces que se dispõe internamente à estrutura do capsídeo viral. Essas partículas passaram a ser chamadas de VLP quiméricas, constituindo-se em um antígeno vacinal muito atraente, já que poderia ser utilizado tanto na profilaxia quanto no tratamento das lesões associadas ao HPV, (GISSMANN *et al.*, 2002).

Conforme seu potencial, a proteína L2 é uma das mais fortes candidatas à aplicação de vacinas profiláticas contra a papilomatose precisamente por oferecer proteção cruzada contra diferentes tipos de PVs (KIRNBAUER *et al.*, 1992).

3.3 Vacina de DNA como Estratégia de Imunização

A vacinação é o método mais eficiente e efetivo no controle de doenças infecciosas. Apesar dos grandes benefícios das vacinas existentes, há ainda muitas doenças para as quais não existem vacinas. Recentemente tem ocorrido o ressurgimento de várias doenças, principalmente nos países em desenvolvimento.

Na última década, o grande avanço da biologia molecular permitiu a introdução de novas estratégias para a obtenção e a produção de antígenos, assim como, foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune. No entanto, a pesquisa de vacinas para o papilomavírus é dificultada pela sua incapacidade de replicação *in vitro* em culturas celulares e pela sua dificuldade de adaptação em culturas de tecidos.

Abordagens terapêuticas baseadas na utilização de peptídeos e proteínas têm atraído a atenção de grupos de pesquisa e a indústria farmacêutica. As proteínas recombinantes de interesse terapêutico vêm ganhando cada vez mais espaço na economia e atualmente já movimentam um mercado anual de cerca de 50 a 60 bilhões de dólares em todo mundo (SCHIMIDT, 2004).

O mercado de produção de biofármacos pode ser dividido em dois segmentos: proteínas que não são pós-traducionalmente modificadas e as que necessitam de tais modificações (especialmente N-glicosilação) para terem atividade biológica. As proteínas não-glicosiladas normalmente são expressas em bactérias ou leveduras e atualmente representam cerca de 40% do mercado (WALSH, 2003).

Bactérias gram-negativas, como por exemplo, *Escherichia coli*, apresentam várias vantagens na expressão heteróloga: a capacidade de produção em grande quantidade, grande capacidade replicativa, simplificadas condições de cultivo e fermentação, fácil manipulação genética e maior facilidade na conversão de bioprocessos para larga escala, técnicas de transformação com DNA exógeno que, além de muito bem estabelecidas, requerem quantidades mínimas de DNA (VERMA *et al.*, 1998). Contudo, devido sua natureza procariótica, o sistema apresenta limitações no processo de modificação pós-traducional, limitando o uso dessa tecnologia. Além disso, há problemas de enovelamento tanto na expressão de proteínas como corpos de inclusão, quanto de proteínas secretadas para o espaço

periplasmático, havendo também problemas de degradação do produto recombinante (ARBABI-GHAHROUDI *et al.*, 2005).

Outro sistema de expressão bastante utilizado são as leveduras, contando com uma maquinaria celular mais complexa para expressão de proteínas que necessitam de modificação pós-traducionais. O uso de leveduras também tem como vantagem a simplicidade no cultivo e nos processos de fermentação quando comparados a células animais (GEMGROSS, 2004). Duas espécies que já estão bem estabelecidas para a produção industrial são *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*. Enquanto *S. cerevisiae* é um dos organismos eucarióticos com melhor caracterização genética e prevalece entre as espécies de leveduras utilizadas na indústria farmacêutica (WALSH, 2003), a levedura metilotrófica *P. pastoris* é atualmente a espécie de levedura mais utilizada para expressão heteróloga de uma forma em geral, graças a alta eficiência dos seus sistemas de expressão e secreção (SCHMIDT, 2004), tendo, por exemplo, uma produção de 10g/L de albumina sérica humana (KOBAYASHI *et al.*, 2000), enquanto em *S. cerevisiae* a produção é de 150 mg/L (SLEEP *et al.*, 1991).

Entre os sistemas de expressão utilizando células animais, as células de insetos transformadas via baculovírus tem alcançado uma popularidade comparável a que *P. pastoris* representa entre as leveduras. Isso porque essas células são consideradas mais resistente ao estresse metabólico, além de serem mais produtivas que células de mamíferos, sendo empregadas para produções em larga escala de proteínas recombinantes (GEORGE *et al.*, 1997). Contudo, os sistemas utilizando células de inseto apresentam algumas limitações devido a infecção pelo baculovírus, sendo repostados problemas de secreção e dobramento correto de proteínas (McCAROLL & KING, 1997) e problemas de degradação devido a proteases expressas, além de diferenças nos padrões de glicosilação e problemas na adição de ácido siálico a proteína heteróloga (IKONOMOU *et al.*, 2003).

A vacina de DNA foi descrita em 1990, quando o plasmídeo contendo um gene repórter que codifica a β -galactosidase expressou a proteína após a inoculação direta no músculo de camundongos (WOLFF *et al.*, 1990). Este estudo avaliou fatores que determinam a eficiência da transferência do gene e da imunogenicidade conferida pela inoculação do plasmídeo. Posteriormente, a inoculação de DNA que codifica uma proteína imunogênica do vírus influenza conferiu imunidade protetora em camundongos (ULMER *et al.*, 1993). A partir destes resultados, o entendimento

sobre o mecanismo imunológico induzido por este tipo de vacina despertou interesse da comunidade científica.

Diversos trabalhos têm demonstrado a indução da imunidade protetora em camundongos pela imunização genética contra uma variedade de microrganismos como vírus (DAVIS & MCCLUSKIE, 1999), bactérias e protozoários (KALINNA, 1997); e ainda, contra o câncer (LIU *et al.*, 2004) e algumas doenças autoimunes (RAMSHAW *et al.*, 1997). Na medicina humana, as pesquisas com vacinas de DNA têm sido direcionadas principalmente para a AIDS, malária e tuberculose (WANG *et al.*, 1998, WANG *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2007). A utilização da vacinação por DNA na terapia contra tumores gerou resultados satisfatórios (LIU *et al.*, 2004) e, recentemente, resultou no controle de crescimento de melanoma em estágio avançado (LIAO *et al.*, 2006).

As vacinas de DNA são vetores de expressão eucarióticos (plasmídeo) que utilizam sinais de transcrição e as organelas das células eucarióticas transfectadas para expressão *in situ* do antígeno. Estas vacinas codificam os genes de uma porção antigênica de um vírus, normalmente sob controle de um promotor viral (HOBSON *et al.*, 2003; ESTCOURT *et al.*, 2004). Alguns plasmídeos possuem CpG não metilados que podem atuar como adjuvantes (TUDOR *et al.*, 2005). As vacinas de DNA são caracterizadas pela baixa expressão de antígeno, apesar de prolongada, capazes de estimular a resposta de células T e B antígeno específica (MOR, 1998; HOWARTH *et al.*, 2004). A ação adjuvante e a imunogenicidade de vacinas de DNA tem sido descrita ser dependente da proteína quinase TANK I (TBK I) (ISHII *et al.*, 2008). A sinalização via TBK I pela vacina de DNA é essencial para resposta de IFN tipo I e necessária para indução de células T e B antígeno-específicas.

Os plasmídeos usados como vacina de DNA devem conter os seguintes elementos essenciais: um promotor eucariótico, como o derivado do citomegalovírus (CMV), o gene de interesse, gene de resistência a antibióticos, sítios de clonagem, uma origem de replicação que permita crescimento em bactéria e incorporação das sequências de poliadenilação, que são capazes de estabilizar os transcritos de RNA mensageiro e são importantes para a translocação deste RNA do núcleo para o citoplasma (DONNELLY e ULMER, 1999). Para a maioria das vacinas de DNA, o promotor CMV é a escolha mais comum porque apresenta níveis altos de expressão

constitutiva em uma extensiva gama de células de mamíferos (KUTZLER & WEINER, 2008).

Recentemente surgiram as vacinas gênicas, nas quais plasmídeos de DNA atuam como vetores direcionando genes ou fragmentos gênicos codificadores de antígenos imunodominantes do patógeno a célula alvo e estimulando tanto resposta humoral quanto celular (LOZES *et al.*, 1997); GURUNATHAN *et al.*, 2000; BRITTON & PALENDIRA *et al.*, 2000). Estudos demonstraram que a qualidade de antígeno produzido *in vivo* após vacinação com DNA varia de picogramas a nanogramas (GURUNATHAN *et al.*, 2000). No entanto, apesar da pequena quantidade de proteína sintetizada o DNA é capaz de induzir eficiente resposta imune. Isso ocorre devido ao fato do próprio DNA apresentar sequências CpG espécie-específicas (KRIEG, 1996).

Na imunização com vacinas gênicas ocorre a transfecção das células e tradução protéica, seguida da sua secreção ou processamento intracelular antigênico. A tradução da proteína é realizada utilizando as organelas da própria célula que foi transfectada. A proteína é degradada no citoplasma por proteases no proteossoma e os peptídeos gerados são transportados através do retículo endoplasmático (RE) pelos transportadores associados ao processamento do antígeno (TAP). Em seguida estes peptídeos são associados, principalmente, as moléculas de classe I do Complexo Principal de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*) e transportados a superfície celular através do complexo de Golgi para apresentação as células T CD8⁺ ou, em menor grau, apresentados para células T CD4⁺ associadas a moléculas de classe II por apresentação cruzada (HOWARTH *et al.*, 2004; STEVENSON, 2004). As proteínas derivadas da vacina gênica podem também ser secretadas, endocitadas e posteriormente degradadas no endossoma por proteases. Em paralelo, as moléculas de classe II do MHC que são sintetizadas no RE estão ligadas a cadeia invariável que bloqueia a união com proteínas endógenas presentes no lúmen do RE. As moléculas de classe II do MHC são direcionadas para o endossomas acidificados contendo os peptídeos antigênicos derivados da clivagem da proteína exógena. Neste local, a cadeia invariável é clivada, ocorre a ligação dos peptídeos antigênicos as moléculas de classe II do MHC e, então estas vesículas são direcionadas para a superfície celular e os complexos antígeno- molécula de MHC de classe II são apresentado as células T CD4⁺.

A transfecção com o plasmídeo pode ocorrer em diferentes tipos celulares: 1) células somáticas que produzem e expressam os antígenos codificados pelo gene presente no plasmídeo, mas como não expressam moléculas coestimulatórias, atuam gerando antígenos que serão endocitados por células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais; 2) DCs imaturas podem ser transfectadas diretamente e, após maturação, podem ativar linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B; 3) DCs imaturas podem adquirir o antígeno indiretamente após a fagocitose de células somáticas transfectadas em apoptose e apresentar o antígeno para linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺; 4) DCs imaturas e linfócitos B, que após endocitose de antígenos solúveis secretados podem apresentá-los aos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Além disso, quando as vacinas são incorporadas pelas APCs, os antígenos também podem ser apresentados de modo cruzado, ou seja, apresentação de antígenos endógenos no complexo de moléculas de classe II do MHC para linfócitos T CD4⁺ (STEVENSON *et al.*, 2004; GIRI *et al.*, 2004; GARMORY *et al.*, 2005).

As vacinas de DNA são, portanto, capazes de induzir ambos os tipos de imunidade protetora, humoral e celular, com a estimulação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, sem alguns dos possíveis riscos associados às vacinas com organismos vivos (DUNHAM, 2002; HENKE, 2002) (figura 10). Após o processamento e apresentação de antígenos pelas APCs, são produzidas citocinas, como a IL-12, que estimula a diferenciação das células T virgens em Th1 efetoras (SIN *et al.*, 1999). Por sua vez, as células Th1 produzem citocinas como o IFN- γ que pode atuar na célula alvo que possui o transgene (OLIVEIRA *et al.*, 1998; NAGATA *et al.*, 2004) e melhorar a expressão de moléculas de MHC classe II pelas células apresentadoras de antígenos, facilitando a apresentação do antígeno e a ativação da célula T.

A imunização com plasmídeos que codificam epítopos de classe I do MHC geralmente induz baixa resposta CTL e somente as construções com epítopos classe II do MHC podem melhorar a amplitude da resposta CTL. Os linfócitos Th são cruciais para o desenvolvimento de uma resposta imune celular eficiente e persistente com geração de resposta CTL de memória e produção de anticorpos (VATAKIS *et al.*, 2005). Evidências em camundongos adultos imunizados com vacinas que expressam epítopos de classe I da gp120 do HIV e epítopos de classe II da ovalbumina mostram que quando não há direcionamento para as moléculas de classe II do MHC por baixa afinidade aos epítopos de classe II resultam em uma deficiente resposta CTL a gp120 (VATAKIS *et al.*, 2005). Além do mais, os

camundongos imunizados com plasmídeos que codifica epítomos de baixa afinidade de classe II desenvolvem menor numero de células T CD4⁺ e CD8⁺ secretoras de IFN- γ . Por isso, as vacinas gênicas que possibilitam o direcionamento de antígenos as moléculas de classe II do MHC são vitais para a ativação de linfócito Th, com consequente expansão clonal de células B antígeno específicas, mudança de classe de anticorpos, geração de células T de memória, aumento da expressão de sinais coestimulatórios e produção de citocinas.

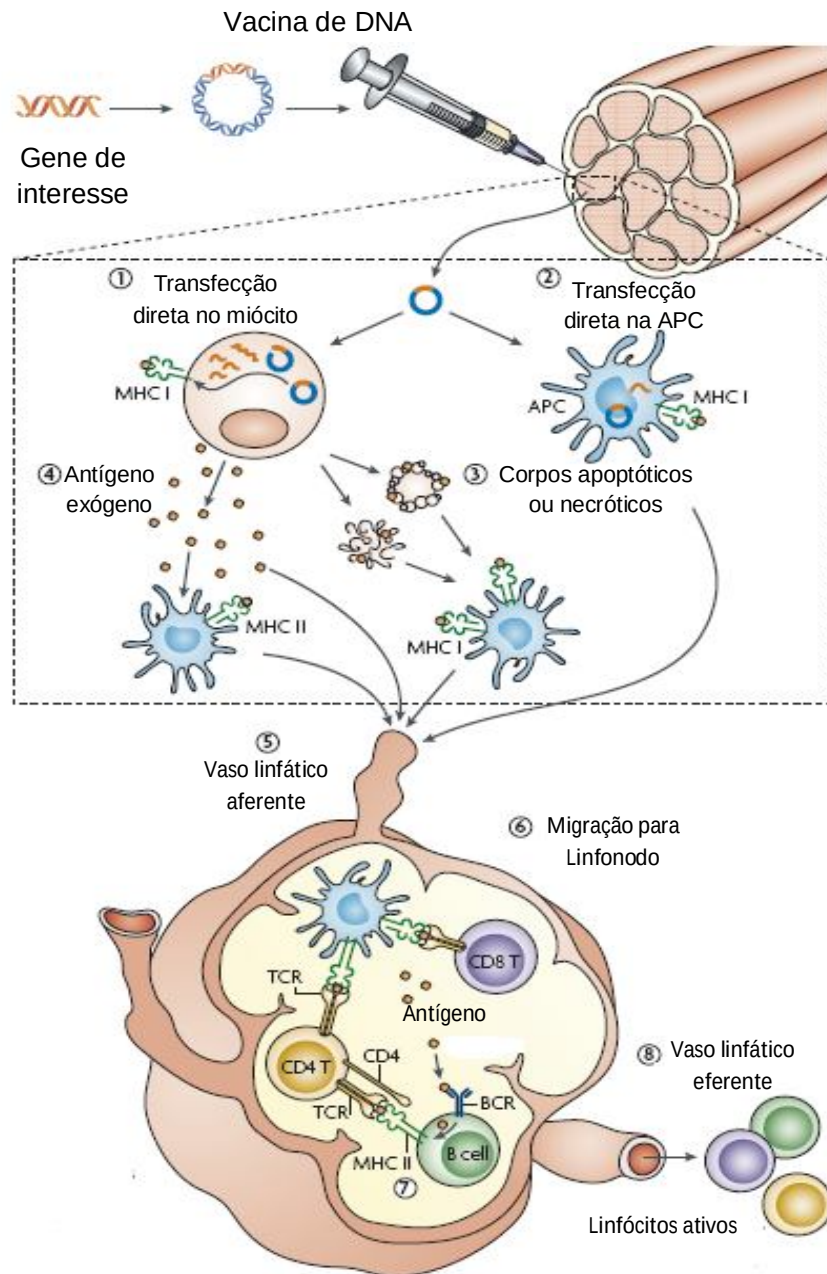


Figura 10. Indução da imunidade humoral e celular pela vacina de DNA. O plasmídeo entra no núcleo dos miócitos ou APC, utiliza a maquinaria celular para transcrição do gene seguida da expressão da proteína no citoplasma e consequentemente a formação dos antígenos protéicos. APC apresenta o antígeno através do MHC I pela transfecção direta (2) ou através da fagocitose de corpos apoptóticos de células transfectadas (3). APCs também exibem o antígeno pelo MHC II quando endocitam o antígeno exógeno (4) liberados pelas células transfectadas. APC carregada com o antígeno migra para o linfonodo pelo vaso linfático aferente (5) onde apresenta o peptídeo para as células T inativas via MHC e receptor do linfócito T (TCR). Esta interação provê os sinais secundários para iniciar uma resposta imune, ativar e ampliar as células T ou, alternativamente, ativar as células B e cascata de produção de anticorpo (KUTZLER & WEINER, 2008).

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

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

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

Os riscos que podem ser gerados com vacinas de DNA, como, a integração do plasmídio ao genoma hospedeiro, gerando mutagênese pela ativação de protooncogenes ou pela inativação de genes supressores de tumor, estão sendo avaliados. Estudos têm mostrado baixa probabilidade de ocorrer integração do

plasmídio. Três diferentes vacinas de DNA contendo genes virais foram avaliadas em camundongos, e se a integração tivesse ocorrido, a frequência seria de oito integrações do DNA por células diplóides. Isto seria três vezes abaixo da frequência de mutação espontânea. Contudo, ensaios de integração são necessários para todos os DNA plasmidiais que serão usados em vacinas para uso clínico. Outros riscos incluem a indução de tolerância, devido à apresentação do antígeno em longo prazo, ou reações auto-imunes devido à indução de anticorpos anti-DNA. Os níveis destes anticorpos têm aumentado de 20-30% em seres humanos, mas não induzem qualquer doença com os títulos apresentados, ao contrário do aumento de 100-1000 vezes detectado em pacientes com doenças autoimunes (HENKE, 2002).

A busca por alternativas para vacinas de DNA levou Preis e Langer a estudar mecanismos diferentes de administração de fármacos, a administração da vacina de DNA pode ser ocorrer por inoculação direta do plasmídio pelas vias intratraqueal, intravenosa, intrabursal, intraorbital, intradérmica, intramuscular, oral, subcutânea e via mucosa demonstraram sucesso na indução da resposta imune em todas as vias testadas (FYNAN *et al.*, 1993; ULMER *et al.*, 1997; UCHIJIMA *et al.*, 1998; REN *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2000; CONG *et al.*, 2005, LI *et al.*, 2006). Entretanto, algumas vias influenciam diretamente na imunogenicidade da vacina. Os níveis de expressão dos antígenos obtidos pelas diferentes vias de administração parecem estar relacionados com a quantidade de células transfectadas obtidas após administração dos plasmídeos. A via intramuscular e a intradérmica liberam o DNA plasmidial no meio extracelular, localização pela qual, a maioria do DNA é rapidamente degradada pelas nucleases (LEVY *et al.*, 1996). Diferentemente, o sistema *gene gun* libera o DNA dentro das células amenizando a perda inicial. Nos trabalhos preliminares avaliando as vias de administração da vacina foi necessária uma concentração de DNA pela via intramuscular 100 vezes maior que o sistema *gene gun* para proporcionar uma resposta imune equivalente (PERTMER *et al.*, 1995; ROBINSON, 1997). Esta estratégia vacinal é bastante eficaz para atingir as células dendríticas, que são as células apresentadoras de antígenos mais potentes e especializadas em ativar os linfócitos T CD8 e CD4 (CONDON *et al.*, 1996; PORGADOR *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 2006).

O sistema *gene gun* utilizado para vacinas de DNA foi avaliado em bovinos, equinos, suínos, caninos e em aves (FYAN *et al.*, 1993; MACKLIN *et al.*, 1998; VANROMPAY *et al.*, 1999). Em galinhas, o *gene gun* foi o sistema mais eficiente

para a liberação da vacina de DNA para influenza (FYNAN *et al.*, 1993). Em perus, a combinação das vias intramuscular e intranasal induziu equivalente proteção contra a *Clamidia psittaci* comparada à liberação obtida pelo *gene gun* (VANROMPAY *et al.*, 1999). Por outro lado, em suínos as imunizações pela via intramuscular da vacina de DNA contra peste suína clássica induziram mais altos títulos de anticorpos do que pelo sistema *gene gun* (ANDREW *et al.*, 2000). Assim, a eficácia da vacina de DNA varia com diversos fatores que podem influenciar nestas vias de administração, como vetor, adsorção às partículas, a espécie animal e o patógeno.

Outros métodos de entrega de DNA as células são: sonoporação e eletroporação, que criam poros transitórios na membrana para que grande moléculas de DNA possam ter acesso ao interior das células, assim como a biobalística e a microinjeção, que liberam os plasmídeos no citoplasma. A eletroporação pode ser utilizada em tecidos humanos e sua aplicação, independente do local, favorece transfecção eficiente em uma variedade de células, inclusive APC. Além disso, como um mecanismo adicional, um dano moderado ao tecido, induzido pela eletroporação, poderia provocar um fluxo de APC, sinais de perigo e aumento na liberação de antígenos pelas células lesadas, aumentando a apresentação dos antígenos (PRUD´HOMME, 2005).

Tabela 01: Resumo das diferentes vias de administração para vacinas de DNA

Método	Vantagens	Desvantagens
Microinjeção direta	Alta taxa de transfecção; evita a degradação citoplasmática e lisossomal do material injetado; técnica muito trabalhosa; requer células muito bem isoladas	Só <i>ex vivo</i> ; potencial para uso em terapia gênica da linhagem germinativa apresenta problemas técnicos e éticos
Eletroporação	Alta taxa de transfecção	Só <i>ex vivo</i> ; muita morte celular torna o procedimento pouco eficiente

Método	Vantagens	Desvantagens
Injeção de plasmídeo	Simplicidade; 2-19 Kb podem ser facilmente transferidos para músculo; uso em vacinação gênica	Baixa porcentagem de fibras expressam o transgen após a injeção; uso restrito a pele, timo e músculo estriado
Injeção balística de DNA	Alta taxa de transfecção; entrega de doses precisas; uso em vacinação gênica	Expressão transitória; lesão celular considerável no centro da região atingida pelo disparo

Fonte: DANI, 2000.

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

Algumas alterações nos vetores têm sido realizadas para melhorar a potência da vacina, como modificações para aumentar a eficiência do promotor, utilização de sequência líder alternativa e otimização de códons. Sabe-se que para melhorar a eficiência da vacina de DNA é preciso aumentar a expressão do antígeno dentro da célula do mamífero (KO *et al.*, 2005). Outra maneira para potencializar a resposta gerada pelas vacinas de DNA as proteínas virais é a inclusão de adjuvantes genéticos como citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimulatórias (SASAKI *et al.*, 2003). A imunização de camundongos com a vacina de DNA contendo o gene de interleucinas (GM-CSF, TNF- α e TNF- β) associada as porções genéticas do HIV-1 pode aumentar a produção de anticorpos específicos e a resposta Th e citotóxica (KIM *et al.*, 2000). Desta maneira, a conjugação de peptídeos virais a genes que estimulam a resposta imune ou direcionem a resposta celular para uma resposta adequada e eficiente tem aperfeiçoado a imunogenicidade das vacinas genéticas. O uso de adjuvantes contendo motivos CpG tem sido uma opção para estimular resposta Th1 em diferentes modelos experimentais.

A imunização com vacina de DNA contendo genes do vírus influenza (BOT *et al.*, 1998; ULMER *et al.*, 1998), vírus do sarampo e vírus Sendai (MARTINEZ *et al.*,

1997), vírus da leucemia murina (SARZOTTI *et al.*, 1996) e vírus da hepatite C (YOUN *et al.*, 2003) mostrou-se eficaz em estabelecer a resposta imune antiviral em alguns modelos murinos. Em humanos, as vacinas de DNA não são tão eficazes, quando administradas como *naked* DNA pelas vias intramuscular ou intradérmica, entretanto tem mostrado resultados promissores quando combinados com outras formas de vacina, como os vetores virais (LU *et al.*, 2008).

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

A saúde do rebanho nacional é fundamental para garantir bom desempenho da cadeia produtiva e desenvolvimento da pecuária brasileira, além da importância para a preservação da saúde pública, por isso, uma estratégia vacinal baseada na imunização genética utilizando L2 dirigida para a prevenção do sarcóide equino e da papilomatose cutânea e câncer de bexiga em bovinos, causados pelo BPV 1, é muito importante. Além da importância econômica do controle da infecção por BPV no contexto da pecuária nacional, este sistema também constitui um bom modelo para o estudo de estratégias vacinais profiláticas aplicadas a infecção pelo HPV em humanos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amplificação do gene L2

O gene L2 foi amplificado por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do genoma completo do BPV 1 clonado no vetor pAT153, com o uso de oligonucleotídeos específicos (tabela 02). Os primers foram desenhados de forma a amplificar o gene L2 com 1,4kb, nesses oligonucleotídeos foram adicionados sítios *XhoI* e *XbaI*, que flanqueiam o gene, de forma a facilitar a clonagem no vetor de expressão, a sequência Kosak no *primer forward* importante para a tradução da proteína em eucariotos, o epítipo AU1 e cauda de histidina foram adicionados para detecção imunológica.

Tabela 02: Sequência dos *primers* para amplificação do fragmento L2.

Primer	Sequência 5' – 3'
<i>Forward</i>	5' CTCGAGRCCATGGACACCTATATAAGTGACGAAA 3'
<i>Reverse</i>	5' ATATCTAGATTAATGATGATGATGATGATGGGCATGTTTCCG 3'

Para a reação, foi utilizada a polimerase de alta fidelidade, *Taq DNA Polymerase High Fidelity* (GE Healthcare), com temperatura de anelamento de 58°C, seguindo as concentrações seguidas na tabela 03.

Tabela 03: Reação de PCR com os *primers* específicos

REAGENTE	[INICIAL]	[FINAL]	VOLUME (µL)
DNA	-	-	3
Tampão	10X	1X	5
MgSO ₄	50mM	1mM	1
dNTP	10mM	0,2mM	1
<i>Primer F e R</i>	10µM	0,4µM	2
<i>Taq DNA Polymerase High Fidelity</i>	5U/µl	1U/µl	0,25
Água	-	-	35,75

O programa usado no termociclador constituiu-se das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 1'; 30 ciclos de 94°C por 30'', 58°C por 30'' e 72°C por 1' com extensão final a 72°C por 5'.

4.2 Clonagem do Gene L2 no Vetor de Expressão pCI-Neo

O gene L2 foi purificado com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega®) e posteriormente ligado ao vetor aberto pGEM-T Easy (Promega®) com o uso da T4 ligase (Promega®), após incubação de 16 horas em temperatura de 4°C, o produto da ligação é usado como agente transformante de células de *Escherichia coli* linhagem DH10α, previamente tratadas pelo sistema de cloreto de cálcio (SAMBROOK *et al.*, 1989).

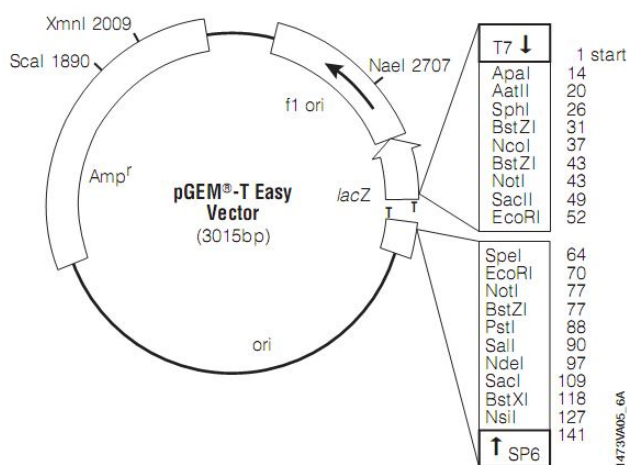


Figura 11. Mapa do vetor circular pGEM-T Easy (Promega®)

Para a transformação, 10ng de DNA e 100µl das células competentes foram incubados no gelo por 30min com posterior choque térmico a 42°C por 2 min. Após 5 min no gelo foi acrescentado 800 µl de LB para recuperação das células por 1 hora a 37°C. Para o plaqueamento, as células foram centrifugadas por 10 min a 1200 rpm, descartando-se 600µl e homogeneizando-se o pellet obtido nos 200µl. Placas com LB e ampicilina (50µg/ml) foram semeadas com 200µl das células e deixadas a 37°C, por 16 horas para crescimento dos transformantes.

Os recombinantes foram analisados quanto à presença da construção pGEM-L2B1, através de mini-extração plasmidial e digestão com as enzimas XhoI e NotI (Promega®) quanto a presença do inserto.

Para extração plasmidial foi usado o protocolo de Sambrook, 1989. Uma vez reconhecidos os clones realizou-se um novo inóculo, desta vez, para mini extração plasmidial para fins de subclonagem no vetor pCI-neo, utilizando o kit *Invisorb Spin Plasmid Mini two* (Invitex®).

O gene L2 foi devidamente liberado do vetor pGEM após a digestão dupla de 16 horas a 37°C com as enzimas de restrição XhoI e NotI (20U/μl, Promega®) e, em seguida, purificado pelo uso do kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®). Paralelamente, o vetor pCI-neo foi digerido com as enzimas para possibilitar a posterior ligação com o inserto L2.

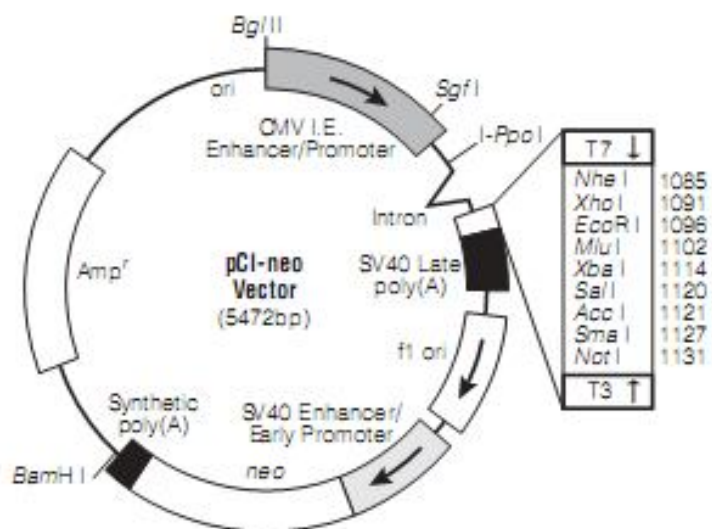


Figura 12. Mapa do vetor circular pCI-neo (Promega®)

As concentrações dos reagentes utilizados nas duas digestões estão representadas na tabela 04. Os produtos purificados foram ligados com uso da enzima T4 ligase (Promega®), após incubação de 16 horas a 4°C, seguindo as concentrações descritas na tabela 05. Esta ligação gerou a construção pCI-L2B1.

Tabela 04: Reação de digestão do pGEM-L2B1 e pCI-neo

REAGENTE	VOLUME	REAGENTE	VOLUME
pGEML2B1(100ng)	10 µl	Vetor pCI-Neo (100ng/ µl)	10 µl
Enzima XhoI (20u/µl)	0,5 µl	Enzima XhoI (20u/µl)	0,5 µl
Enzima NotI (20u/µl)	0,5 µl	Enzima NotI (20u/µl)	0,5 µl
Tampão (Buffer D)	2 µl	Tampão (Buffer D)	2 µl
BSA	0,2 µl	BSA	0,2 µl
H ₂ O	6,8 µl	H ₂ O	6,8 µl
TOTAL	20 µl	TOTAL	20 µl

Tabela 05: Reação de ligação do vetor pCI-neo e fragmento L2

REAGENTE	VOLUME
Vetor pCI-neo (50ng)	5 µl
Fragmento L2(100ng)	1,5 µl
Enzima T4 ligase 10u/µL	1 µl
Tampão 10x	2 µl
Água	10,5 µl
TOTAL	20 µl

Tabela 06: Reação de digestão do pCI-L2B1

REAGENTE	VOLUME
pCIL2B1 (100ng)	8 µl
Enzima XhoI (20u/µl)	0,5 µl
Enzima NotI (20u/µl)	0,5 µl
Tampão (Buffer D)	2 µl
BSA	0,2 µl
H ₂ O	8,8 µl
TOTAL	20 µl

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

A análise dos clones foi feita através de extração plasmidial utilizando o kit *Invisorb Spin Plasmid Mini two* (Invitex[®]), digestão com as respectivas enzimas de restrição (tabela 06), PCR e sequenciamento.

Para detecção do inserto, foi utilizado um *primer forward* que parecia no pCI-neo e um *primer reverse* que parecia na porção interna do gene, gerando um fragmento de 1400pb (Tabela 07). A análise da orientação deste inserto também foi feita através da PCR usando enzimas de restrição, originando dois fragmentos de 3,8 kb e 3kb respectivamente. As duas reações seguiram as concentrações e condições descritas nas 08 e 09.

Tabela 07: Reação de PCR para os *primers* de detecção e orientação do fragmento L2.

REAGENTE	[INICIAL]	VOLUME (μL)
DNA	-	1
Tampão	10X	2,5
MgSo ₄	50mM	0,5
dNTP	10mM	0,5
<i>Primer F</i>	10μM	1,5
<i>Primer R</i>	10μM	1,5
GoTaq (Promega)	5U/μl	0,2
Água	-	12

O programa usado no termociclador constitui-se das seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 1'; 35 ciclos de 94°C por 20'', 56°C por 40'' e 72°C por 30''; extensão final a 72°C por 2'.

Tabela 08: Digestão para verificar orientação do fragmento L2.

REAGENTE	VOLUME
pCIL2B1 (100ng)	8 µl
Enzima EcoRI (20u/µl)	0,5 µl
Enzima KpnI (20u/µl)	0,5 µl
Tampão	2 µl
BSA	0,2 µl
H ₂ O	8,8 µl
TOTAL	20 µl

Tabela 09: Sequência dos *primers* para detecção do fragmento L2.

Primer	Sequência 5' – 3'
Forward pCI-Neo	5' TTTGCCTTTCTCTCCACAGG 3'
Reverse Interno L2	5' CAGCTGGTTCTGCTTCATACA 3'

4.3 Sequenciamento do Gene L2

A construção pCI-L2B1 foi submetida a reação de sequenciamento, a quantidade de DNA enviada foi de 100ng, juntamente com cada oligonucleotídeo específico, *primers* para o vetor pCI-neo, a uma concentração de 15pmol, como descrito na tabela 10. Os primers pareiam nas regiões que flanqueiam o gene de interesse, permitindo a verificação da matriz de leitura do mesmo. As amostras foram sequenciadas no Núcleo Integrado de Tecnologia (NIT) do CPqAM, utilizando o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões previamente estabelecidos nesta unidade. As sequências resultantes foram analisadas pelo programa Clustal IX.

Tabela 10: Sequência dos *primers* para sequenciamento do plasmídeo pCIL2B1.

Primer	Sequência 5' – 3'
<i>Forward</i> pCI-Neo	5' TTTGCCTTTCTCTCCACAGG 3'
<i>Reverse</i> pCI-Neo	5' GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC 3'

4.4 Transfecção da Construção pCI-L2B1

4.4.1 Cultivo e Transfecção In Vitro de células HEK 293

Células eucarióticas HEK 293 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Invitrogen®) acrescido de 10% soro bovino fetal (Gibco®), 1% penicilina/estreptomicina (Gibco®), 1% L-glutamina (Sigma®) – DMEM completo. Após as células atingirem uma confluência de aproximadamente 80%, foram transfectadas em placa de cultura de 6 poços com 4µg do vetor pCIL2B1 em 6x10⁵ células/mL de HEK 293 e 16µl do Polyfect Transfection Reagent (Qiagen®), de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante. Em seguida foi acrescido meio DMEM completo para a manutenção celular e incubado por 48 horas (37°C /5% de CO₂). As células foram também transfectadas com a mesma quantidade de DNA, utilizando o plasmídeo pCI-neo vazio, como controle negativo, e como controle positivo da transfecção o gene repórter da β-galactosidase.

4.4.1.1 Avaliação da eficiência de expressão utilizando o gene repórter β-galactosidade

As células transfectadas com o plasmídeo contendo o gene repórter da β-Galactosidase foram incubadas (48 horas /37°C /5% de CO₂) e processadas para a avaliação da eficiência de transfecção, pela atividade de expressão do gene repórter. Após 48 horas da transfecção, as células 293 foram submetidas a reação de coloração do β-gal. Inicialmente, as células foram lavadas duas vezes com 2 ml em 1X PBS (Phosphate-buffered saline, Dulbecco) e fixadas em 1ml de solução 0.2% glutaraldeído por 5 minutos. Nova lavagem com 1X PBS foi realizada, e em

seguida, as células fixadas foram incubadas em um volume final de 1ml de uma solução contendo 20mg de X-Gal, 0.005M de ferriclamida de potássio, 0.005M de ferrociamida de potássio, 0.002M de $MgCl_2$ em 1X PBS, para o desenvolvimento de coloração pela atividade de β -gal. A incubação foi de 2 horas a 37°C/5% de CO_2 .

Alguns testes foram feitos para testar a eficiência e toxicidade do reagente de transfecção (Polyfect Transfection Reagent - Qiagen). Foram divididos em dois grupos de acordo com a proporção do reagente de transfecção e DNA. Na primeira situação, tivemos a adição 32 μ l do reagente, 4 μ g de DNA e $3,5 \times 10^5$ de células 293, e na outra situação, foi adicionada a quantidade total indicada pelo fabricante, 16 μ l do reagente de transfecção, 4 μ g de DNA e $6,0 \times 10^5$ de células.

4.5 Análise da Expressão da Proteína L2

4.5.1 Extração de RNA total das células 293 transfectadas

As células foram cultivadas em placa de 6 poços e transfectadas nas condições já descritas. Dois poços continham o controle negativo da transfecção (apenas com as células 293), outros dois o vetor vazio pCI-neo e mais dois, o pCIL2B1. As duas primeiras situações foram utilizadas como controle negativo. Após 48 horas da transfecção, o meio DMEM foi retirado e as células lavadas 1X com 1ml de PBS estéril. Em seguida, foi acrescentado 500 μ l de tripsina e incubado por 30 segundos a 37°C. Para inativação da tripsina foi acrescentado 1ml de meio DMEM completo e o volume referente aos dois poços de cada situação foram transferidos para tubo falcon 15ml e centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos. O pellet foi guardado a -80°C para posterior extração.

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

4.5.2 Síntese de cDNA e RT-PCR

A construção do cDNA foi realizada a partir do kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega®). As amostras, controle negativo da transfecção, pCI-neo e pCIL2B1 foram preparadas em duplicata, adicionando 4µl de RNA de cada amostra, juntamente com 1µl do primer oligo dT 15 (Promega®), incubados à temperatura de 70°C, por 5 minutos e no gelo, por mais 5 minutos. Para controle negativo do primer foi preparada uma amostra com 4µl de água livre de RNA e 1µl do primer oligo dT 15. A reação para a transcrição reversa, na presença da transcriptase reversa, e na sua ausência (controle negativo), está descrita na tabela 11.

Tabela 11: Reação para a transcrição reversa e controle negativo.

REAGENTE	VOLUME	Controle negativo	
		REAGENTE	VOLUME
Água livre de nuclease	7µl	Água livre de nuclease	8µl
dNTP (10mM)	1µl	dNTP (10mM)	1µl
MgCl ₂	2µl	MgCl ₂	2µl
Tampão 5x	4µl	Tampão 5x	4µl
Transcriptase Reversa	1µl	Transcriptase Reversa	-
Total	15µl	Total	15µl

Para cada amostra, foi adicionado 15µl da reação com e sem transcriptase para incubação a 25°C, por 5 minutos, 42°C, por 1 hora e 70°C, por 15 minutos. No controle negativo, apenas com água e primers específicos (tabela 12) foi adicionado o mix com transcriptase reversa. A amplificação foi feita através da RT-PCR (Reverse-Transcriptase Polimerase Chain Reaction – Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa), os reagentes e volumes seguem na tabela 13.

Tabela 12: Sequência dos *primers* utilizados na RT-PCR

Primer	Sequência 5' – 3'
Forward L2B1	5'- TGAGGACACTGTGCTACCAGAG -3'
Reverse L2B1	5'- CAGCTGGTTCTGCTTCATACA - 3'

Tabela 13: Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa

REAGENTE	VOLUME	Controle negativo	
		REAGENTE	VOLUME
cDNA	4,75 µl	cDNA	-
Primer Forward	0,75 µl	Primer Forward	0,75 µl
Primer Reverse	0,75 µl	Primer Reverse	0,75 µl
Master Mix	6,25 µl	Master Mix	6,25 µl
H ₂ O	-	H ₂ O	4,75 µl
Total	12,5 µl	Total	12,5µl

O programa utilizado no termociclador foi de 95°C por 3 minutos (desnaturação inicial); 30 ciclos de 94° por 1 minuto, 57°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos; extensão final de 10 minutos a 72°C.

4.5.3 Avaliação da produção da proteína L2 por SDS-PAGE

As células 293 transfectadas com o vetor vazio pCI-neo e com a construção pCIL2B1, após 48 horas, foram ressuspensas em 600µl de tampão 2X Laemmli desnaturante (10% SDS, 1M Tris-HCl pH6.8, Glycerol, Água e Azul de Bromofenol) mais inibidor de protease (Roche), em uma proporção de 1:1 (volume referente a placa de cultura de 6 poços). A lise celular foi realizada de forma mecânica, com ajuda da agulha de insulina, e os extratos aquecidos a 95°C durante 5 minutos. As amostras protéicas dos extratos celulares foram guardadas a -20°C para análises subsequentes.

Os extratos protéicos foram submetidos a uma eletroforese (250V e 30mA) em gel SDS-PAGE 12,5% e coradas com Coomassie blue.

4.5.4 Avaliação da produção da proteína L2 através de Western Blot

Após fracionadas em gel SDS-PAGE 12,5% (250V e 30mA) as proteínas foram transferidas por 30 minutos (25V e 400mA) para membranas Immobilon-P (Millipore, Bedford, MA) em sistema semi-seco de transferência (Bio-Rad, Hercules, CA). Posteriormente, a membrana foi bloqueada em solução 5% leite em 1X PBS-0,01%Tween, incubada com o anticorpo monoclonal (1:500) específico contra o epítipo AU1, 1 hora sob agitação, e lavadas 3X (15 minutos cada) em 1X PBS-

0,05%Tween. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário (1:5000) anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Jackson ImmunoResearch®), 1 hora sob agitação, lavadas e reveladas utilizando um kit de ECL (Amersham, England, UK®).

5. RESULTADOS

5.1 Artigo: Desenvolvimento de uma estratégia baseada em vacina de DNA contra infecção por *Papilomavírus bovino*, incluindo os gene E5 ou L2

O artigo foi submetido e aceito pela revista *Genetics and Molecular Research* (GMR), como podemos observar no apêndice. O artigo segue na íntegra em anexo deste trabalho.

5.2 Amplificação do gene L2 de BPV 1

A padronização com o par de *primers* FL2B1/RL2B1 resultou na formação de uma banda de cerca de 1400 pb, demonstrando que estes *primers* mostram-se específicos para o gene L2 de BPV 1 (Figura 13).

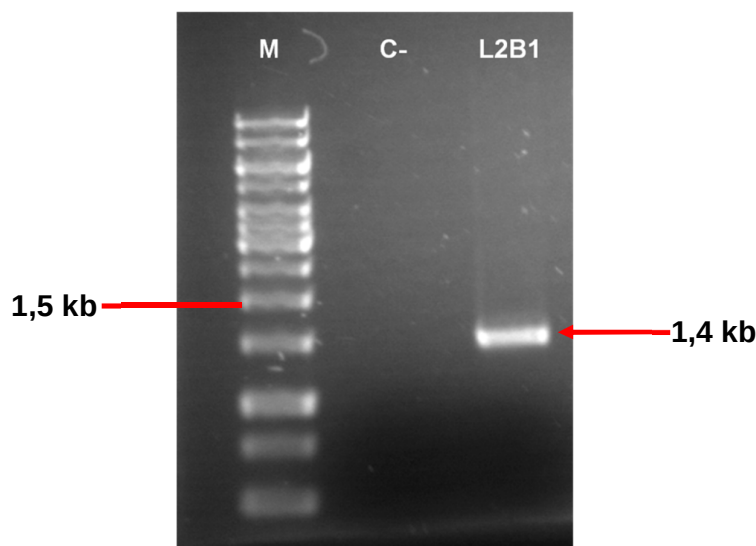


Figura 13. Gel evidenciando o resultado da amplificação do gene L2 de BPV 1. 1- Marcador 1 Kb DNA Ladder (Ludwig); C- controle negativo da reação; B1- DNA amplificado. Para eletroforese do produto amplificado foi utilizado gel de agarose na concentração de 0,8%. A separação das moléculas de DNA se deu durante 30 minutos sob a aplicação de uma diferença de potencial de 100 volts. O tampão de eletroforese (corrida) utilizado foi o TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) e o volume do produto de PCR aplicado no gel foi de 5µl.

5.3 Clonagem do Gene L2 no Vetor de Expressão pCI-Neo

O gene L2 (BPV1) purificado e o vetor pGEM-T foram utilizados em duas reações de ligação nas proporções vetor:inserto de 3:1 e 5:1. A enzima *Taq* polimerase frequentemente adiciona uma única desoxiadenosina em cada extremidade 3' dos amplicons. O vetor pGEM-T, por sua vez, possui *overhangs* 3' – T (terminações 3' de desoxitimina), aumentando assim a eficiência da ligação do inserto ao plasmídeo por prevenir a recircularização do vetor. Portanto, o vetor pGEM-T permite a clonagem direta dos produtos de PCR sem que para isso seja necessária digestão prévia do vetor com enzimas de restrição (Clarck, 1988; ROBLES & DOERS, 1994).

As reações foram processadas e o produto de cada ligação foi inserido em células de *E. coli* DH5 α , através do processo de transformação. Durante a reação de ligação, o inserto quebra o gene β -galactosidase (enzima que degrada o substrato cromógeno Xgal, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosídeo, permitindo a identificação de recombinantes) do pGEM, tornando a *E. coli* incapaz de metabolizar a lactose e seus similares como o X-Gal. As colônias que metabolizam o X-gal, geram subprodutos que reagem com o IPTG (isopropil-3-D-tiogalactopiranosídeo) corando-se em azul. A coloração azul das colônias deve-se à ação da β -galactosidase, enquanto na presença do inserto não há degradação de Xgal. As colônias que não metabolizam o X-gal permanecem brancas facilitando visualizar os recombinantes que possuem a construção pGEML2B1.

As colônias recombinantes foram analisados quanto à presença das construções através de mini-prep plasmidial e digestão com as enzimas *Xho*I e *Not*I (*Promega*) que liberam o gene L2. O resultado foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

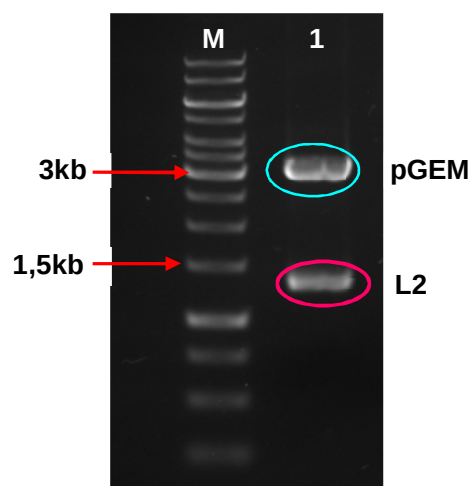


Figura 14. Digestão do DNA plasmidial extraído das colônias transformadas com a construção pGEM-L2B1. M- Marcador 1kb (Ludwig); 1- construção digerida. Eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos.

Uma vez reconhecidos os clones portadores da construção pGEM-L2B1, por digestão, o gene L2 liberado do vetor de passagem foi cortado do gel de agarose para purificação com Kit da GE Healthcare (figura 15), para fins de subclonagem no vetor pCI-Neo. O qual também foi submetido à purificação para possibilitar a reação de ligação.

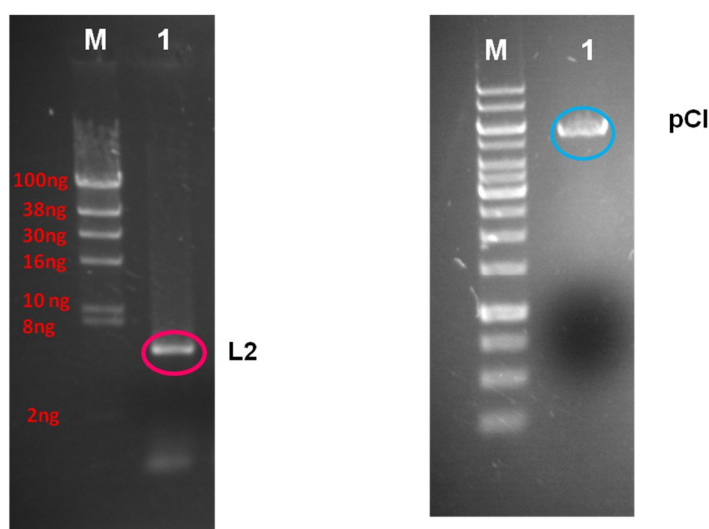


Figura 15. Quantificação do gene L2 do BPV-1 e do pCI-Neo. M- Marcador lambda Hind III (Invitrogen); 1 - DNA purificado BPV1. M- Marcador 1kb (Ludwig); 1 - pCI purificado. Quantificação em gel de agarose numa concentração de 0,8%. A separação das moléculas de DNA ocorreu durante um tempo de 30 minutos sob aplicação de uma diferença de potencial de 100 V. O tampão de eletroforese (corrida) usado foi o TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) e o volume do DNA purificado aplicado no gel foi de 1 µl.

Foi possível verificar a existência de quatro clones (pCIL2B1) nos quais estaria presente o gene de interesse. Os oligonucleotídeos utilizados (*forward* pCI-neo / *reverse* interno L2) amplificaram um fragmento de 1400pb, correspondendo a uma porção do vetor pCI-neo e parte do gene L2, como ilustrado na figura 16.

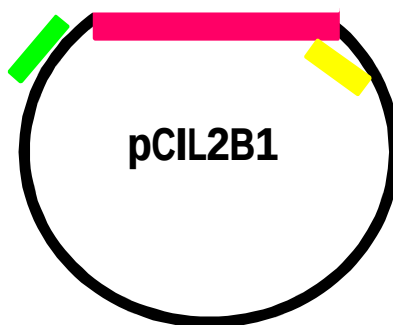


Figura 16. Esquema da PCR para detecção do clone pCIL2B1. Pareamento dos primers *forward* pCI-neo (em verde) e *reverse* interno L2 (em amarela) na construção pCIL2B1. O gene L2 representado em rosa e o vetor pCI-neo em preto. Amplificação de um fragmento de 1400pb.

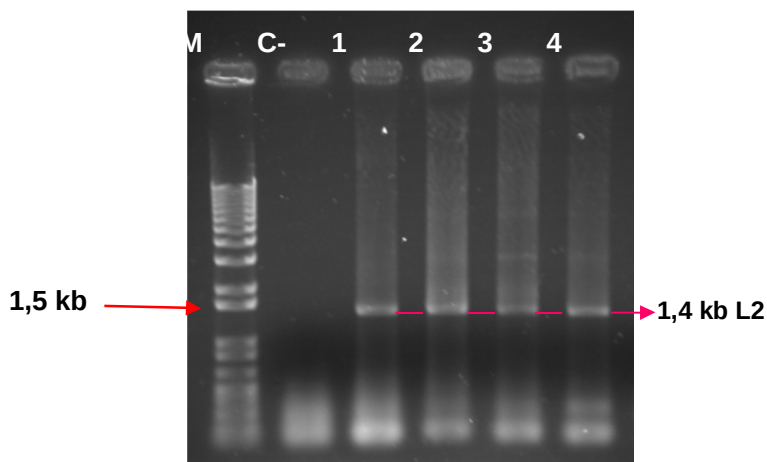


Figura 17. PCR de colônia transformadas evidenciando o gene L2 da construção pCI-L2B1. M- Marcador 1kb DNA Ladder (Invitrogen®); C-: controle negativo; 1 a 4 – produto da PCR. Eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos.

A clonagem do gene L2 no vetor de expressão pCI-neo foi comprovada por digestão dupla com as enzimas XhoI e NotI, liberando um fragmento de 1400pb,

relativo a sequência de L2 (figura 18); e por sequenciamento (*forward* pCI-neo e *reverse* pCI-neo).

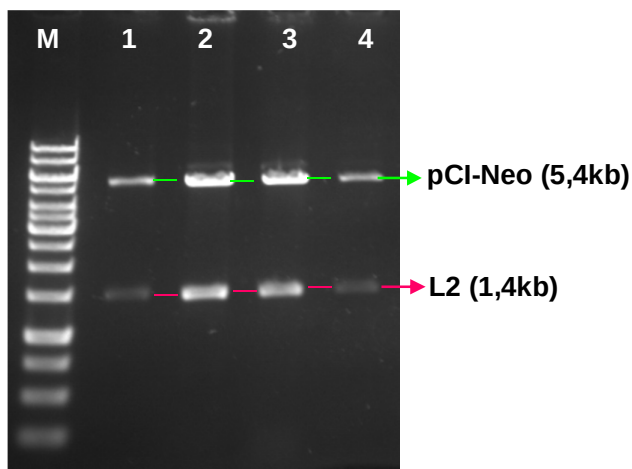


Figura 18. Construção do vetor pCIL2B1neo. M- marcador molecular 1kb (Ludwig); 1 a 4- pCI-L2B1 digerida *XhoI-NotI*. Eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos.

5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA L2

5.4.1 Avaliação da eficiência de expressão utilizando o gene repórter β -galactosidade

Alguns testes foram feitos para comparar a eficiência e toxicidade do reagente de transfecção (PolyFect - Qiagen®). Inicialmente, foram divididos dois grupos de acordo com a proporção do reagente de transfecção e DNA e quantidade células. Na primeira situação, tivemos a adição de metade do reagente recomendado pelo fabricante, não alterando a quantidade de DNA recomendada (4 μ g para placa com 6 poços), e na outra situação, foi adicionada a quantidade total indicada pelo fabricante. Além desta variável, submetemos os dois grupos a quantidade de células diferentes, 3,5 x 10⁵ recomendado pelo fabricante e 6x10⁵ de células 293. De acordo com os resultados obtidos, observamos que as amostras com maior número de células e menor volume do reagente mostrou-se com maior eficiência de transfecção, 80% de eficiência.

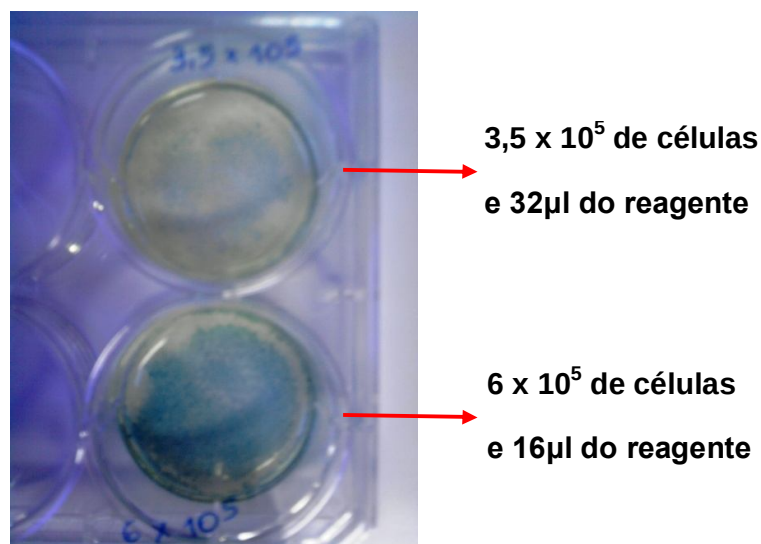


Figura 19. Avaliação da eficiência de transfecção. Avaliação da eficiência de transfecção com duas variáveis (quantidade de células e volume do reagente de transfecção).

5.4.2 Análise da Transcrição do Gene L2

Com o intuito de avaliar a presença de RNA mensageiro e consequentemente confirmar a ocorrência de transcrição do gene L2, o RNA total foi extraído (48 horas após a transfecção) para realização de uma RT-PCR, em células 293 transfectadas contendo a construção pCIL2B1, o vetor vazio pCI-neo. Foram utilizados como controles negativo o vetor vazio pCI-neo e células 293 sem vetor.

Um fragmento de 500 pb referente ao gene L2, amplificado do cDNA obtido com a transcrição reversa, foi observado nas amostras transfectadas com a construção pCIL2B1 (Figura 20), e os controles negativos não apresentaram nenhuma amplificação.

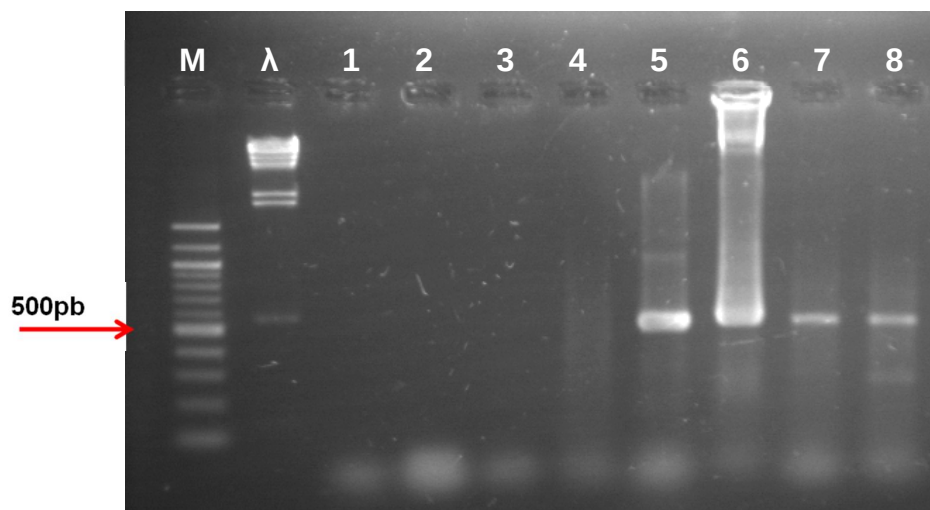


Figura 20. RT-PCR das células transfectadas com HEK 293. M- marcador molecular 100 pb; λ- Marcador Lambda Hind III (Invitrogen); 1 - controle da reação; 2 - controle negativo (sem transcriptase reversa); 3 - controle da transfecção (só células); 4 - transfecção com vetor pCI-neo; 5 - controle positivo (L2B1); 6 a 8- transfecção com construção pCIL2B1neo. Eletroforese em gel de agarose 2% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos.

Para descartar a possibilidade de contaminação das amostras de RNA total com DNA, uma reação de PCR sem a transcriptase reversa foi realizada para todas as amostras. A PCR realizada com este material foi negativa, indicando que não houve contaminação com DNA e a amplificação do fragmento de 500 pb observada nas amostras com transcriptase reversa é um indicativo que o gene L2 está sendo transcrito, já que apenas as amostras transfectadas com a construção pCIL2B1 apresentou este padrão de banda.

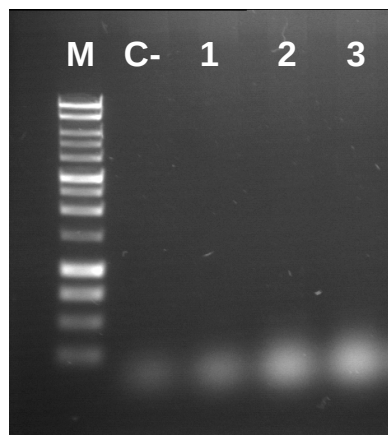


Figura 21. PCR das construções transfectadas com 293 sem transcriptase. M- marcador molecular 100 pb; C - controle negativo da reação; 1- transfecção com vetor pCI-neo; 2 e 3-

transfecção com construção pCIL2B1neo. Eletroforese em gel de agarose 2% em TAE; Voltagem aplicada de 100V(10V/cm²) por 30 minutos.

5.4.3 Avaliação da Produção da Proteína L2 através de gel SDS-PAGE

As células 293 transfectadas com o vetor vazio pCI-neo e com a construção pCIL2B1 foram lisadas após 48 horas de transfecção e foram submetidas a uma eletroforese em gel SDS-PAGE na concentração de 12,5%, para verificação da integridade das proteínas, assim como a presença de L2, proteína de interesse. As células 293, sem transfecção, também foram lisadas e analisadas.

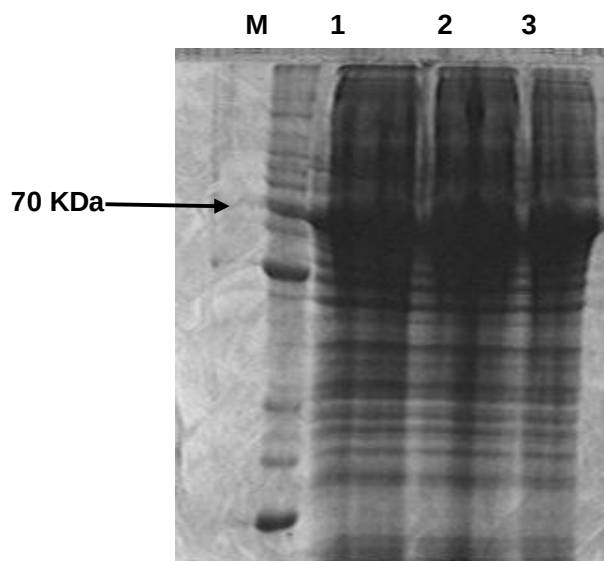


Figura 22. Análise por eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE. Análise por eletroforese de proteínas em gel SDS-PAGE dos extratos das células 293 transfectadas sem plasmídeos, transfectadas com o vetor vazio pCI-neo e com a construção pCIL2B1. M: Marcador Bench Marker (Sigma). Poço 1: extrato das células 293; poço 2: vetor vazio pCI-neo e poço 3: pCIL2B1. Gel SDS-PAGE (12,5%), corado com Coomassie blue.

A eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% foi estabelecida como padrão para análise da expressão da proteína L2 em células de mamíferos, pois apresentou um perfil de separação das proteínas celulares, mais homogênea e menos densa.

5.4.4 Avaliação da Produção da Proteína L2 por Western Blot

As amostras foram analisadas quanto à expressão de L2 por Western Blot, 48 horas pós-transfecção. Todas as amostras foram quantificadas pelo método de Bradford em diluição seriada, posteriormente, fracionadas em gel SDS-PAGE 12,5% e transferidos para membrana de nitrocelulose. Apenas nas células transfectadas com a construção pCIL2B1 foi possível detectar a proteína L2 no tamanho esperado, de 72 KDa (Figura 23), e a quantidade de extrato celular utilizado, foi de 60µg. O peso molecular da proteína L2 foi confirmado, utilizando o marcador Prestained, que possui a última banda equivalente a um peso de 70 KDa.

Estes dados sugerem que houve uma eficiente tradução da proteína L2 nas células transfectadas com a construção pCIL2B1. Estes resultados confirmam a expressão do antígeno vacinal em células de mamíferos.

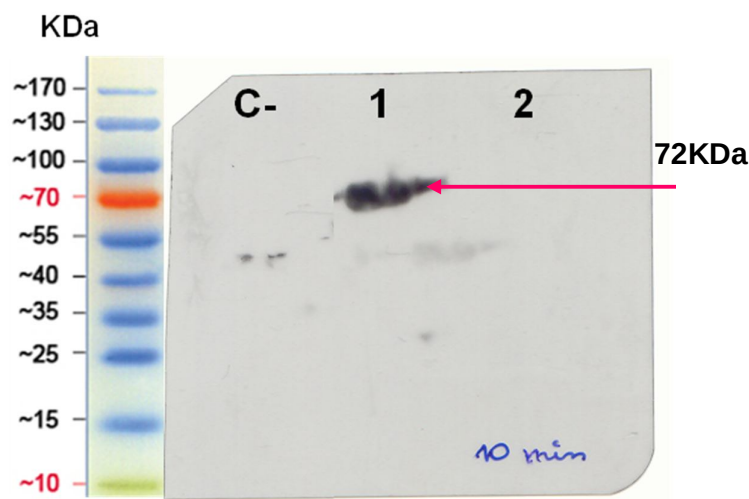


Figura 23. Western blot da proteína L2 de BPV-1. Western blot da proteína L2 de BPV-1 expressa em células de mamíferos. O anticorpo anti-AU1 detectou a proteína L2 apenas nas células transfectadas com a construção pCIL2B1. C-: células sem o vetor; 2: células apenas com o vetor; ambas como controle negativo. M: Marcador de peso molecular Prestained (Fermentas®).

6. DISCUSSÃO

É sabido que os papilomavírus são vírus que infectam queratinócitos e fibroblastos, causando lesões na pele, no tecido mucoso e podendo conduzir processos neoplásicos (ZUR HAUSEN, 1996; CAMPO, 2006). Nesse sentido, destacam-se o poder oncogênico do papilomavírus, o BPV representa um grave problema econômico do ponto de vista pecuário, em virtude de sua correlação com papilomatoses, cânceres de bexiga e do trato gastrointestinal superior, não havendo diferença na prevalência da patologia entre os sexos ou entre raças, sendo mais frequente em animais com menos de dois anos de idade (Corrêa & Corrêa, 1992).

Por isso, promover uma metodologia de profilaxia viável e eficaz contra as doenças causadas por papilomavírus constitui um objetivo de grande interesse veterinário e econômico.

Uma estratégia vacinal dirigida para a prevenção do sarcóide em equinos e da papilomatose cutânea e câncer de bexiga em bovinos é muito importante, principalmente no que diz respeito aos diferentes tipos de PVs, tornando assim L2 uma forte candidata a vacina por conferir resposta imune cruzada.

Inicialmente, o gene L2 foi amplificado a partir do genoma viral completo de BPV 1 por PCR, gerando um fragmento de 1400pb. Os oligonucleotídeos desenhados possuem sítios de XhoI e XbaI que flanqueiam o gene, assim como epítopo que facilitam a imunodeteção. A purificação com kit do gene amplificado ocorreu de forma prática e sem grandes perdas de material, o material purificado apresentou boas concentrações de DNA o que facilitou sua posterior ligação no vetor de passagem pGEM-T.

A construção pGEML2B1 foi confirmada por digestão enzimática, apresentando padrões de bandas esperados do inserto e vetor. Esses resultados possibilitaram a continuidade do trabalho para que o gene L2 fosse subclonado no vetor de expressão.

O vetor pCI-Neo foi linearizado a partir de digestão enzimática e purificado para posterior ligação ao inserto, a construção pCIL2B1 foi confirmada a partir de digestão enzimática, PCR e sequenciamento. Nesta etapa grandes modificações de protocolos foram feitas, visto que o vetor religava-se, possivelmente pelas digestões ocorrerem de forma parcial. No entanto, no gel de agarose a visualização se dava de forma a interpretar digestão completa do vetor, observando-se uma única banda o

que era esperado para compreender que o mesmo estivesse de forma linear. A utilização do *Blue Green* (Ludwig) na eletroforese facilitou a visualização de outras bandas mostrando que o pCI não estaria completamente linearizado.

Outras modificações de protocolo também foram realizadas, como a utilização de uma enzima (CIAP) para desfosforilar o vetor. Durante a ligação do DNA *in vitro* a enzima DNA-ligase só irá catalisar a formação da ligação fosfo-diester se um nucleotídeo contiver um grupo fosfato na posição 5' e o outro contiver um grupo hidroxila na posição 3'. Se o grupo fosfato em ambas extremidades 5' do DNA do vetor for removido por tratamento com fosfatase alcalina, a tendência do vetor de recircularizar será, portanto minimizada. Por outro lado, um inserto de DNA estranho possui grupos fosfato nas suas extremidades 5' capazes de serem ligados aos grupos hidroxila nas extremidades 3' do vetor. Esse método, portanto, aumenta a frequência de células contendo DNA recombinante.

Contudo, essa medida não foi suficiente para solucionar o problema, mesmo alterando o protocolo recomendado pelo fabricante da enzima os resultados eram insatisfatórios, ou o vetor se religava ou não havia junção com o inserto.

A partir da construção do plasmídeo gênico (pCIL2B1) foram feito testes de transfecção, realizados em células embrionárias de rim humano (HEK 293). A linhagem HEK 293 é uma linhagem de células embrionária de rim também imortalizada pela transfecção de fragmentos de DNA e vem sendo utilizada para expressão de proteínas com potencial anti-inflamatório (CAO, 2004).

Testes de transfecção com o gene β -gal foram realizados, com o intuito de estabilizar e otimizar o protocolo para esse processo. Com as modificações ocorridas, observamos que o protocolo sugerido pelo fabricante do reagente lipossomal de transfecção apresentava menor eficiência e maior toxicidade, frente as modificações realizadas pelo nosso grupo de pesquisa. Com a otimização do protocolo os testes de transfecções mostraram-se eficiente.

As transfecções realizadas em 293 mostraram-se capaz de transfectar DNA a partir de um reagente lipossomal, verificando a ocorrência da transcrição do gene L2 a partir de RNA mensageiro.

Estudos que comparam a eficiência de transfecção transiente entre as metodologias de fosfato de cálcio e lipídeos catiônicos normalmente apontam a segunda estratégia como mais eficiente (ABULL-HASSAN *et al.*, 2000; NOWLING *et al.*, 2002).

Segundo Patil *et al.*, 2005 e Romorem *et al.*, 2005, transfecção com lipídeos catiônicos apresentam relativa toxicidade, que varia de acordo com o tipo celular e de acordo com a quantidade de lipídeos utilizada na relação lipídeo – DNA para a formação dos complexos. Sendo que, quanto maior a quantidade de lipídeos em relação a quantidade de DNA, maior é o efeito citotóxico. A toxicidade é atribuída ao excesso de cargas positivas (DASS, 2004), uma vez que ao se utilizar formulações contendo maiores quantidades de lipídeos com cargas neutras/negativas, a toxicidade do complexo mostra-se menor (PATIL *et al.*, 2005; ROMOREM *et al.*, 2005). Embora o mecanismo de toxicidade por excesso de cargas positivas ainda não esteja bem elucidado, acredita-se que elas comprometem a integridade da membrana plasmática.

A posterior os testes de transfecção, realizou-se a RT-PCR dos clones com a construção vacinal pCIL2B1, confirmando-se a presença do RNA mensageiro do gene L2, com o uso de oligonucleotídeos iniciadores complementares a regiões internas ao gene L2, amplificando uma região de 500 pb. Como controles foram utilizados, o BPV1 como controle positivo mostrando que o RNA estava sendo traduzido, os controles negativos foram as células 293 transfectadas e o vetor vazio pCI-neo. Este resultado nos dá um subsídio importante para analisar a presença da proteína L2 no meio intracelular.

Visando analisar a expressão bruta de proteínas e para comprovar que as mesmas estavam íntegras foi feito um SDS-PAGE, usando extratos celulares fracionados de acordo com o tamanho das moléculas. Géis SDS-PAGE 12,5% foram corridos com diversas concentrações dos extratos celulares, entretanto, a banda esperada (72KDa), correspondente a proteína L2, não pôde ser visualizada na amostra de pCIL2B1, possivelmente pela presença de várias proteínas encontradas no extrato de mesmo peso molecular.

No entanto, a proteína L2 foi observada facilmente apenas na amostra pCIL2B1, sem a necessidade de otimização de códons, por imunodetecção através da técnica de Western Blot. As amostras quantificadas anteriormente por diluição seriada foram aplicados em SDS-PAGE e transferidos para membrana de nitrocelulose, obtendo-se melhor resultado quando aplicado 60µg do extrato, dessa forma quando revelado o filme, posterior ligação dos anticorpos primário e secundário conjugado a peroxidase, foi possível visualizar a banda de aproximadamente 72KDa correspondente a L2 de forma bastante concentrada.

Os anticorpos podem ser marcados de diferentes maneiras, podem ser usados em sistemas de detecção direta ou indireta. Nos métodos de detecção direta, o anticorpo purificado é marcado apropriadamente com uma molécula identificadora (fluoresceína, rodamina, biotina, etc.) e, então, é usado diretamente para se ligar a proteína alvo. Nos sistemas de detecção indireta, o anticorpo primário é usado como uma molécula intermediária e não é ligado diretamente a um composto identificador. Uma vez que se liga ao seu alvo, o anticorpo primário é, dessa forma, ligado a um reagente secundário, (a proteína A ou a um anticorpo secundário), o qual é conjugado a uma molécula identificadora, que pode ser fluorocromo, uma enzima (peroxidase, fosfatase alcalina, β -galactosidase, etc.) ou o ouro coloidal. Os sistemas de detecção direta têm a desvantagem de que uma grande variedade de anticorpos primários pode necessitar ser conjugados a moléculas identificadoras, enquanto que os sistemas indiretos oferecem o uso de anticorpos secundários purificados por afinidade, que estão prontamente disponíveis comercialmente.

Neste trabalho, nós descrevemos a expressão da proteína L2 de BPV 1 em células de mamíferos, que mostraram-se eficiente como primeiro passo para implementação de uma estratégia vacinal baseada na imunização genética contra infecções por papilomavírus.

A imunização genética 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 (CHANDRACHUD *et al.*, 1995; Candido *et al.*, 2003), suínos (GERDTS *et al.*, 1997), caninos (SUZICH *et al.*, 1995) e coelhos (SUNDARAM *et al.*, 1997; HAN *et al.*, 1999; HU *et al.*, 2002), entre outros. No caso de bovinos há estudos envolvendo Vírus da Herpes Bovina tipo 1 (BHV-1), Vírus Sincicial Respiratório Bovino (BRSV) e Vírus da Dirréia Bovina (BVDV) (SCHRIJVER *et al.*, 1997). Esta estratégia é capaz de proteger o hospedeiro contra novas infecções virais e regressão das lesões papilomatosas já estabelecidas. Nesse aspecto, a vacina de DNA apresenta várias vantagens atraentes como a sua simplicidade na produção, estabilidade de temperatura, segurança biológica e a capacidade de uma administração repetida (LIN *et al.*, 2006).

Segundo o trabalho desenvolvido por Karanam e colaboradores em 2009, mostrou que a vacinação em gado com L2 de BPV2 reduziu o tamanho do inóculo e facilitou a eliminação espontânea desses papilomas do tipo 2. O mesmo autor

também verificou, que animais imunizados com L2 de HPV produziu anticorpos neutralizantes (anti-L2 monoclonais) capaz de neutralizar uma gama de genótipos de HPV.

Estes estudos sugerem que L2 contem regiões protetoras, principalmente na região N-terminal, no entanto, pesquisas ainda são necessárias, pois o estudo com polipetídeos de L2 demonstraram conferir proteção cruzada ou a um único tipo de infecção pelo papilomavírus. De acordo com Jagu *et al.*, 2009, esse problema poderia ser solucionado com a utilização de vacinas com concatenados múltiplos fusionados da proteína L2, derivados de capsômeros conhecidos, resultando em maior imunidade a uma gama de HPVs clinicamente relevantes. Esses princípios têm orientado melhor os estudos para definir os epítomos neutralizantes de L2 e otimizar as formas de liberação do plasmídeo.

Muitos aspectos da proteína L2 foram estudados separadamente, mas o papel e função geral do ciclo viral não têm sido exaustivamente formulados, (PEREIRA *et al.*, 2009)

Em trabalho realizado por Lira, 2010, com o objetivo de construir um vetor gênico para vacina profilática utilizando E5 de BPV 1 e 2, a autora sugeriu que a otimização de códons de E5 BPV1/2 é capaz de gerar níveis de expressão consideráveis da proteína nas células de mamíferos.

Outros sistemas de expressão vêm sendo estudados para imunização contra papilomavírus, no entanto, os resultados obtidos em expressão heteróloga não tem sido satisfatório. Segundo Pokoj *et al.*, 2009, testes comparativos entre expressão em *E. coli* e *P. pastoris*, mostraram desvantagem no sistema bacteriano de expressão, pois há mudanças no folder da proteína frequentemente observados em proteínas-alvo, ainda a formação de agregados insolúveis, tais como corpos de inclusão, e / ou oligomerização que pode levar a uma proteína biologicamente inativa. Neste mesmo trabalho, o autor relata que para o aumento da expressão em *P. pastoris* são necessários a otimização de códons e um bom sistema de fermentação.

De acordo com Bazan, 2007, em trabalho realizado com L1 de HPV-16 utilizando expressão heteróloga em leveduras metilotróficas, a expressão de L1 não foi observada em *Hansenula polymorpha*, possivelmente pela impossibilidade da expressão desta proteína em sistema constitutivo. Em *Pichia pastoris* a expressão intracelular de L1 teve rendimentos baixíssimos.

Recentemente vários grupos de pesquisa têm gerado *Virus-like particles* (VLPs) sintetizando a proteína L1 isolada ou juntamente com L2 utilizando sistemas heterólogos de expressão, como baculovírus ou leveduras. Utilizando-se de modelos animais em ensaios de infecção *in vitro* se demonstrou que anticorpos contra VLPs apresentam um forte potencial imunológico (CAMPO, *et al.*, 1991). Contudo, num estudo comparativo entre as respostas imunes contra VLPs e capsômeros, com HPV-33, observou-se que as duas estratégias possuem uma grande similaridade sugerindo que a maioria dos epítomos de neutralização está inteiramente dentro dos capsômeros. Além disso, o anti-soro com capsômeros tem uma resposta cruzada oito vezes maior em ELISA do que aquele com VLPs, sugerindo que a maior parte dos epítomos que induzem anticorpos de resposta cruzada estão mascarados dentro da estrutura das VLPs e se tornam acessíveis nos capsômeros (Fligge *et al.*, 2001).

Baseado no exposto, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que apenas as células transfectadas com a construção pCIL2B1 apresentaram transcrição do gene L2 e consequente produção da proteína, confirmando a expressão do vetor vacinal em células de mamífero.

7. CONCLUSÃO

Os dados apresentados nos permitem comprovar que o vetor vacinal pCIL2B1 foi corretamente construído e teve sua funcionalidade, no que se refere a expressão da proteína L2, comprovada. Desta forma a construção pCIL2B1 poderá ser usada para estudos imunogênicos para avaliar seu potencial como uma estratégia vacinal contra a infecção pelo BPV-1.

8. REFERÊNCIAS

- ABULL-HASSAN, K.; WALMSLEY, R. & BOULTON, M. Optimization of non- viral gene transfer to human primary retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res.*20(5):361-6, 2000.
- AICHINGER, G., KARLSSON, L., JACKSON, M.R., VESTBERG, M., VAUGHAN, J.H., TEYTON, L., LECHLER, R.I., PETERSON, P.A. Major histocompatibility complex class II-dependent unfolding, transport, and degradation of endogenous proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 29127-29136, 1997.
- ALBUQUERQUE, M.; SOUTO, M.; KOMMERS, G. *et al.* Neoplasmas da bexiga associados à hematúria enzoótica bovina. *Ciência Rural.* v.36, n.5, p.1647-1650, 2006.
- ANDREW, M. C.; MORRISSY, C. J.; LENGHAUS, C.; OKE, P. G.; SPROAT, K. W.; HODGSON, A. L. M.; JOHNSON, M. A.; COUPER, B. E. H. Protection of pigs against classical swine fever with DNA delivered gp55. *Vaccine, Kidlington,* v.18, p.1932-1938, 2000.
- ARAIBI, E.H., MARCHETTI, B., ASHRAFI, G.H., CAMPO, M.S. Down regulation of MHC class I in bovine papillomas. *J. Gen. Virol.* 85, 2809–2814, 2004.
- ARAIBI, E.H.; MARCHETTI, B.; DORNAN, E.S.; ASHRAFI, G.H.; DOBREMYSKYJ, M.; ELLIS, S.A. E CAMPO, M.S. The E5 oncoprotein of BPV-4 does not interfere with the biosynthetic pathway of non-classical MHC class I. *Virology* 353:174–183, 2006.
- ARBABI-GHAHROUDI, M.; TANHA, J. & MACKENZIE, R. Procariotic expression antibodies. *Cancer Meta. Rev.* 24:501-519, 2005.
- ASHRAFI, G.H.; TSIRIMONAKI, E.; MARCHETTI, B.; O'BRIEN, P.M.; SIBBET, G.J.; ANDREW, L.; CAMPO, M.S. Down-regulation of MHC class I by bovine papillomavirus E5 oncoproteins. *Oncogene* 21(2):248-59, 2002.
- ASHRAFI, G.H.; BROWN, D.R.; FIFE, K.H.; CAMPO, M.S.; Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. *Virus Research* 120 (2006) 208-211, 2006.
- AZEVEDO, V.; LEVITUS, G.; MIYSHI, A.; CÂNDIDO, A.L.; GÓES, A.M.; OLIVEIRA, S.C.. Main features of DNA based immunization vectores. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research, Ribeirão Preto,* v.32, n.2, p.147-153, 1999.
- BAKER, T.S.; NEWCOMB, W.W.; OLSON, N.H.; COWSERT, L.M.; OLSON, C.; BROWN, J.C.. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophysical Journal,* v. 60, p. 1445-1456, 1991.
- BAZAN, S.B. Expressão da Proteína L1 do Capsídio de HPV-16 em Leveduras Metilotróficas. 106P. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BEDELL, M.A.; HUDSON, J.B.; GOLUB, T.R.; TURYSKY, M.E.; HOSKEN, M.; WILBANKS, G.B.; LAIMINS, L.A. Amplification of human papillomaviruses genomes in vitro is

dependent on epithelial differentiation. *Journal of Virology*. V. 65, n. 5, p. 2254 – 2260, 1991.

BORZACCHIELLO, G. *et al.* Presence of bovine papillomavirus type 2 DNA and expression of the viral oncoprotein E5 in naturally occurring urinary bladder tumours in cows. *J. Gen. Virol.* 84:2921-6, 2003.

BORZACCHIELLO G & ROPERTO F. Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Vet. Res.* 39: 45, 2008.

BOOY, F.P.; RODEN, R.B.; GREENSTONES, H.L.; SCHILLER, J.T.; TRUS, B.L. Two antibodies that neutralize papillomavirus by different mechanisms show distinct binding patterns at 13 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* v. 281, n. 1, p. 95 – 106, 1998.

BOT A, BOT S, GARCIA-SASTRE A, BONA C. Protective cellular immunity against influenza virus induced by plasmid inoculation of newborn mice. *Dev Immunol*, 5(3):197- 210, 1998.

BRITTON, W.J.; PALENDIRA, U. Comparison of the protective efficacy of bacille calmette-Guerin vaccination against aerosol challenge with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Clin Infect Dis.* v. 30, p. S299-301, 2000.

BUCK, C.B.; THOMPSON, C.D.; PANG, Y.S.; LOWY, D.R. E SCHILLER, J.T. Maturation of Papillomavirus Capsids. *J Virol* 79:2839-2846, 2005.

BUCK, C.B. CHENG, N.; THOMPSON, C.D.; LOWY, D.R.; STEVEN, A. C. SCHILLER, J.T. AND TRUS, B. L. Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid. *Journal of Virology*, p. 5190–5197, June 2008.

CAMPO, M. S. Vaccination against papillomavirus. *Can. Cells*, New York, v.3, n.11, p.421-426, Nov. 1991.

CAMPO, M.S.; JARRETT, W.F.H.; BARRON, R.; O'NEIL, B.W.; SMITH, K.T.. Association of bovine papillomavirus type 2 and bracken fern with bladder cancer in cattle. *Cancer Research*, v. 52, p. 6898-6904, 1992.

CAMPO, M.S. Vaccination against papillomavirus in cattle. *Clin Dermatol* 15:75-283, 1997a.

CAMPO, M.S. Vaccination against papillomavirus in cattle. *Clin Dermatol* 15:75-283, 1997b.

CAMPO, M.S. Persistent infection by bovine papillomavirus. In: Ahmed, R., Chen, I.S.Y. *Persistent Viral Infections*. Wiley, pp. 503-516, 1998.

CAMPO, M.S. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 89:249-261, 2002.

CAMPO, M.S. Papillomavirus and disease in humans and animals. *Vet Comp Oncol* 1: 3-14, 2003.

CAMPO, M.S. Bovine papillomavirus: old system, new lessons? In Campo, M.S. (Eds) Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond. Caister Academic Press, Wymondham, Chap 23, 2006.

CANDIDO A.L, RESENDE M. E BESSA L.R.G. 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, 2003.

CAO, H. Expression, purification, and biochemical characterization of the antiinflammatory tristetraprolin. A zinc-dependent mRNA binding protein affected by posttranslational modifications. Biochemistry. 43(43):13724-13738, 2004.

CHAMBERS, G.; ELLSMORE, V.A.; O'BRIEN, P.M.; REID, S.W.; LOVE, S.; CAMPO M.S, NASIR, L. Sequence variants of bovine papillomavirus E5 detected in equine sarcoids. Virus Res. 96(1-2):141-5, 2003.

CHANDRACHUD LM, GRINDLAY GJ, MCGARVIE GM, O'NEIL BW, WAGNER ER, JARRETT WF, CAMPO MS. (Vaccination of cattle with the N-terminus of L2 is necessary and sufficient for preventing infection by bovine papillomavirus-4. Virology. 211(1):204-8, 1995.

CHOO, K.B.; PAN, C.C.; HAN, S.H. Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. Virology v. 161, p. 259 – 261, 1987.

COMBELAS, N., SAUSSEREAU, E., FLEURY, M. J.J., RIBEIRO, T., GAITAN, J., DUARTE-FORERO, D. F., COURSAGET, P., TOUZÉ, A. Papillomavirus pseudovirions packaged with the L2 gene induce cross-neutralizing antibodies. Journal of Translational Medicine, 8:28, 2010.

CONDON C., WATKINS S.C., CELLUZZI C.M., THOMPSON K. AND FALO L.D. JR, DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. Nat. Med. 2: 1122–1128, 1996.

CONFER, A.W. & PANCIERA, R.J. The urinary system. In Thomson's Special Veterinary Pathology, 3^a ed. Pag. 235-77. Editora WW Carlton & JF Zachary. St Louis, Missouri: Mosby, 2001.

CONG, H., GU, Q. M., ZHOU, H. Y., GUO, L., YANG, T. L., HE, S. Y., LI, Y., ZHAO, Q. L. Oral mixed DNA vaccine protects mice from infection of *Toxoplasma gondii*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi, v.23, n.3, p.159-162, 2005.

CONRAD, M., V. J. BUBB, AND R. SCHLEGEL. The human papillomavirus type 6 and 16 E5 are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. J. Virol. 67:6170–6178, 1993.

CONWAY, M.J. AND MEYERS, C. Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. CRITICAL REVIEWS IN ORAL BIOLOGY & MEDICINE. J Dent Res 88(4):307-317, 2009.

CORRÊA W.M. & CORRÊA, C.N.M. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos: Papilomatoses*. Rio de Janeiro, Medsi, 2.ed. 843p., 1992.

CRESSWELL, P, BANGIA, N., DICK, T., DIETRICH, G. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol. Rev.* 172, 21–28, 1999.

DANI, S.U. *Terapia Gênica: Vetores para terapia gênica*. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, 28 – 33, 2000.

DASS, C. R. Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med.* 82:579-591, 2004.

DAVIS, H. L., MCCLUSKIE, M. J. DNA vaccines for viral diseases. *Microbes Infection*, Berlin, v.1, n.1, p.7-21, 1999.

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

DÖBEREINER, J. *et al.* Ocorrência de hematúria enzoótica e de carcinomas epidermóides no trato digestivo superior em bovinos no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.2, p.489-504, 1967.

DONNELLY, J.J. E ULMER, J.B. DNA vaccines for viral diseases. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32: 215-222, 1999.

DUNHAM, S.P. The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine. *Res. Vet. Sci.* 73(1):9-16, 2002.

DURÃO, J.F.C. *et al.* Aspectos anatomopatológicos e clínicos da hematúria enzoótica dos bovinos. *Rev. Port. Cienc. Vet.*, Lisboa, v.90, n.515, p.132-137, Jul./Set. 1995.

ESTCOURT MJ, MCMICHAEL AJ, HANKE T. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1. *Immunol Rev.* Jun; 199:144-55, 2004.

FLIGGE, C., SCHAFER, F., SELINKA, H.C., SAPP, C., SAPP, M. DNA-induced structural changes in the papillomavirus capsid. *J Virol* 75:7727-7731, 2001.

FRAZER, I.H. Immunology of papillomavirus infection. *Curr Opin Immunol* 8:484-491, 1996.

FREITAS, A.C; CARVALHO, C.; BRUNNER O.; BIRGEL, JR. E.H., LIBERA, A.M.D.; BENESI, F.J.; BEÇAK, W. AND STOCCO DOS SANTOS, R.C. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the vírus: a discussion about BPV-1. *Braz J Microbiol* 34: 76-78, 2003.

FREITAS, A.C; SILVA, M.A.R.; CARVALHO, C.C.R.; BIRGEL, JR. E.H.; SANTOS, J.F.; BEÇAK, W.; STOCCO DOS SANTOS, R.C. Papillomavirus DNA detection in non epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 2007.

FYAN, F. F.; WEBSTER, R. G.; FULLER, D. H.; HAYNES, J. R.; SANTORO, J. C.; ROBINSON, H. L. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal,

and gene gun inoculations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.90, n.42, p.11478-11482, 1993.

GARMORY HS, PERKINS SD, PHILLPOTTS RJ, TITBALL RW. DNA vaccines for biodefence. *Adv Drug Deliv Rev.* Jun 17;57(9):1343-61. 2005.

GAUKROGER, J.; CHANDRACHUD, L.; JARRETT, W.F.H.; MCGARVIE, G.E.; YEUDALL, W.A.; MCCAFFERY, R.E.; SMITH, K.T. E CAMPO M.S Malignant transformation of a papilloma induced by bovine papillomavirus type 4 in the nude mouse renal capsule. *J Gen Virol* 72:1165-1168, 1991.

GEORGE, H. J.; MARCHAND, P.; MURPHY, K.; WIWALL, B. H. DOWLING, R.; GIANNARA, J. HOLLIS, G. F.; TRZASCOS, J. M. & COPELAND, R. A. Recombinant human 92-kDa type IV collagenase/gelatinase from baculovirus-infected insect cells: expression, purification, and characterization. *Protein Expr Purif.* 10: 154- 161, 1997.

GERDTS V., JONS A. E MAKOSCHEY B. Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. *J Gen Virol* 78:2139-2146, 1997.

GERNGROSS, T. U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotech.* 22(11): 1409-1414, 2004.

GIRI M, UGEN KE, WEINER DB. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade. *Clin Microbiol Rev.* Apr; 17(2):370-89, 2004.

GISSMAN, L.; OSEN, W.; MULLER, M.; JOCHMUS, I. Therapeutic vaccines for human papillomaviruses. *Intervirology.*44:167-75. 2002.

GLENTING, J.; WESSELS, S. Ensuring safety of DNA vaccines. *Microbial Cell Factories*, Barcelona, v.4, n.26, p.1-5, 2005.

GOLDSMIDT, M.H. & HENDRICK, M.J. Equine sarcoid. In: *Tumours in Domestic Animals*, 4th edition, pp 88–89. Iowa: Iowa State University Press, 2002.

GROMME, M., UYTDEHAAG, F.G., JANSSEN, H., CALAFAT, J., VAN BINNENDIJK, R.S., KENTER, M.J., TULP, A., VERWOERD, D., NEEFJES, J. Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10326-10331, 1999.

GURUNATHAN, S.; KLINMAN, D.M.; SEDER, R.A. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 18, p. 927-974, 2000.

HAN, R.; REED, C.A.; CLADEL, N.M. AND CHRISTENSEN, N.D. 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, 1999.

HATAMA, S.; NOBUMOTO, K.; KANNO, T.. GENOMIC AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF TWO NOVEL BOVINE PAPILLOMAVIRUSES, BPV9 AND BPV10. *THE JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY*, v. 89, p. 158-163, 2008.

HEGDE, R. S. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31, 343–360, 2002.

HENKE, A. DNA immunization – a new chance in vaccine research? *Medical microbiology and immunology*, Berlin, v.191, p.187-190, 2002.

HOBSON P, BARNFIELD C, BARNES A, KLAVINSKIS LS. Mucosal immunization with DNA vaccines. *Methods*. Nov;31(3):217-24, 2003.

HOPKINS, N.C.G. Aetiology of enzootic haematuria. *Vet. Rec.*, London., v.118, n.26, p.715-717, Jun. 1986.

HOWARTH M, ELLIOTT T. The processing of antigens delivered as DNA vaccines. *Immunol Rev*. Jun;199: 27-39, 2004.

HOWLEY, PM; E LOWY, DR. Papillomaviruses and their replication, p. 2197–2229. In P. M. Howley and D. M. Knipe (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., 2001.

HOWARTH M, ELLIOTT T. The processing of antigens delivered as DNA vaccines. *Immunol Rev*. Jun; 199: 27-39, 2004.

IKONOMOU, L.; SCHNEIDER, Y. J. & AGATHOS, S. N. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*. 62:1-20, 2003.

ISHII KJ, KAWAGOE T, KOYAMA S, MATSUI K, KUMAR H, KAWAI T, et al. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature*. Feb 7;451(7179):725-9, 2008.

JACKSON M.E. & CAMPO M.S. 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, 1995.

JARRETT, W.F.H.; MCNEAL, P.E.; GRIMSHAW, T.R.; SELMAN, I.E.; MCINTYRE, W.I.M.. High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papillomavirus. *Nature*, v. 274, p. 215-217, 1978.

JELÍNEK, F.; TACHEZY, R. Cutaneous papillomatosis in cattle. *Journal of Comparative Pathology*, v. 132, p. 70-81, 2005.

KANODIA, S.; FAHEY, L.M; E KAST, W.M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets* 7(1):79-89, 2007.

KALINNA, B.H. DNA vaccines for parasitic infections. *Immunology and Cell Biology*, Camberra, v.75, p.370-375, 1997.

KARANAM, B., JAGU, S., HUH, W. K. AND RODEN, R. B. S. Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunology and Cell Biology* 87, 287–299, 2009.

KAWANA, K., T. YASUGI, T. KANDA, N. KINO, K. ODA, S. OKADA, Y. KAWANA, T. NEI, T. TAKADA, S. TOYOSHIMA, A. TSUCHIYA, K. KONDO, H. YOSHIKAWA, O. TSUTSUMI, AND Y. TAKETANI. Safety and immunogenicity of a peptide containing the cross-neutralization epitope of HPV16 L2 administered nasally in healthy volunteers. *Vaccine* 21:4256–4260, 2003.

KIM SK, RAGUPATHI G, CAPPELLO S, KAGAN E, LIVINGSTON PO. Effect of immunological adjuvant combinations on the antibody and T-cell response to vaccination with MUC1- KLH and GD3-KLH conjugates. *Vaccine*. Oct 15;19(4-5):530-7, 2000.

KIRNBAUER, R.; BOOY, F.; CHENG, N.; LOWY, D.R. AND SCHILLER, J.T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 89:12180-12184, 1992.

KOBAYASHI, K.; KUAWAE, S.; OHYA, T.; OHDA, T.; OHYAMA, M.; OHI, H.; TOMOMITSU, K. & OHMURA, T. High-level expression of recombinant human serum albumina from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. *J Biosci Bioeng.* 89:55-61, 2000.

KO, HYUN-JEONG; KO, SUNG-YOUL; KIM, YEON-JEONG; LEE, EUN-GAE; CHO, SANG-NAE; KANG, CHANG-YUIL. Optimization of Codon Usage Enhances the Immunogenicity of a DNA Vaccine Encoding Mycobacterial Antigen Ag85B. *Infection and Immunity*, 73: 5666-5674. 2005.

KODIHALLI, S., KOBASA, D.L. AND WEBSTER, R.G. Strategies for inducing protection against avian influenza A virus subtypes with DNA vaccines. *Vaccine*, 18, 2592–2599, 2000.

KONDO, K.; ISHII, Y.; OCHI, H.; MATSUMOTO, T.; YOSHIKAWA, H.; KANDA, T. Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region. *Virology* v. 358, n. 2, p. 266 - 272, 2007.

KRIEG, A.M. An innate immune defense mechanism based on the recognition of CpG motifs in microbial DNA. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 128, p. 128-133, 1996.

KUTZLER, M.A. AND WEINER, D.B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature*, 9, 776-788, 2008.

LEAL, AM; FERRAZ, OP; CARVALHO, C; FREITAS, AC; BENISTON, RG; BEÇAK, W; CAMPO, M.S; STOCCO DOS SANTOS, R.C. Quercetin induces structural chromosome aberrations and uncommon rearrangements in bovine cells transformed by the E7 protein of bovine papillomavirus type 4. *Journal of Comparative Oncology*, 2003.

LEVY, M. Y.; BARRON, L. G.; MEYER, K. B.; SZOKA, F. C. Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into the blood. *Gene Therapy*, Pittsburgh, v.3, p.201-211, 1996.

LI, L.; FANG, W.; LI, J.; HUANG, Y.; YU, L. Oral DNA vaccination with the polyprotein gene of infectious bursal disease virus (IBDV) delivered by the attenuated

Salmonella elicits protective immune responses in chickens. *Vaccine*, Kidlington, v.24, n.33-34, p.5919-5927, 2006.

LIAO, J. C. F.; GREGOR, P.; WOLCHOK, J. D.; ORLANDI, F.; CRAFT, D.; LEUNG, C.; HOUGHTON, A.N.; BERGAMAN, P. J. Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibodies responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immunity*, New York, v.6, n.8, p.2- 10, 2006.

LIN, C.T., TSAI, Y.C., HE, L., CALIZO, R., CHOU, H.H., CHANG, T.C., SONG, Y.K., HUNG, C.F., LAI, C.H. A DNA vaccine encoding a codon-optimized Human Papillomavirus Type 16 E6 gene enhances CTL response and anti-tumor activity. *Journal of Biomedical Science* 13: 481-488, 2006.

LIU, W.J.; FRAZER, I.H.; ZHAO, K-N.; WILLIAMS AND ZHOU, J. Nucleotides 1506-1625 of Bovine papillomavirus Type 1 genome can enhance DNA packaging by L1/L3 capsids. *Virology* 259, 211-218, 1999.

LIU, M.; ACRES, B.; BALLOUL, J. M.; BIZOUARNE, N.; PAUL, S.; SLOS, F.; SQUIBAN, P. Gene- based vaccines and immunotherapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v.101, n.2, p.14567-14571, 2004.

LONGWORTH, M. S., AND L. A. LAIMINS. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J. Virol.* **78**:3533-3541, 2004.

LOWE, J., PANDA, D., ROSE, S., JENSEN, T., HUGHES, W.A., TSO, F. Y., ANGELETTI, P. C. Evolutionary and structural analyses of alpha-Papillomavirus capsid proteins yields novel insights into L2 structure and interaction with L1. *Virology Journal*, 5:150, 2008.

LOZES, E.; HUYGEN, K.; CONTENT, J.; DENIS, O.; MONTGOMERY, D.L.; YAWMAN, A.M.; VANDENBUSSCHE, P.; VAN VOOREN, J.P.; DROWART, A.; ULMER, J.B.; LIU, M.A. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. *Vaccine*. v. 15, p. 830-833, 1997.

LU Y, RAVIPRAKASH K, LEAO IC, CHIKHLIKAR PR, EWING D, ANWAR A, et al. Dengue 2 PreM-E/LAMP chimera targeted to the MHC class II compartment elicits long-lasting neutralizing antibodies. *Vaccine*. May 16;21(17-18):2178-89, 2003.

MACKLIN, M. D.; MCCABE, D.; MCGREGOR, M. W.; NEUMANN, V.; MEYER, T.; CALLAN, R.; HINSHAW, V. S.; SAWAIN, W. T. Immunization of pigs with a particle-mediated DNA vaccine to influenza A virus protects against challenge with homologous virus. *The Journal of Virology*, Princeton, v.72, p.1491-1496, 1998.

MARCHETTI, B., ASHRAFI, G.H., TSIRIMONAKI, E., O'BRIEN, P.M., CAMPO, M.S. The bovine papillomavirus oncoprotein E5 retains MHC class I molecules in the Golgi apparatus and prevents their transport to the cell surface. *Oncogene* 21(51):7808-16, 2002.

MARTINEZ, X., BRANDT, C., SADDALLAH, F., TOUGNE, C., BARRIOS, C., WILD, F., et al. DNA immunization circumvents deficient induction of T helper type 1 and cytotoxic T

lymphocyte responses in neonates and during early life. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 5;94(16):8726-31, 1997.

MCCARROLL, L. & KING, L. A. Stable insect cultures for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol*. 8: 590-594, 1997.

MELO, C.B. & LEITE, R.C. *Papilomatose Bovina*. *Ciênc. Vet. Tróp*. 6(1):12, 2003.

MEYERS, C., MAYER, T.J., OZBUN, M.A. Synthesis of infectious human papillomavirus type 18 in differentiating epithelium transfected with viral DNA. *Journal of virology*, 71: 7381 – 7386, 1997.

MODIS, Y.; TRUS, B.L. E HARRISON, S.C. Atomic model of the papillomavirus capsid. *The EMBO Journal* 21 (18): 4754-4762, 2002.

MOREL, P. A.; FALKNER, D.; PLOWEY, J.; LARREGINA, A. T.; FALO JR., L. D. DNA immunization: altering the cellular localization of expressed protein and the immunization route allows manipulation of the immune response. *Vaccine*, Kidlington, v.22, p.447–456, 2004.

MOR G. Plasmid DNA: a new era in vaccinology. *Biochem Pharmacol*. Apr 15; 55(8):1151-3, 1998.

MOTER, R.L., HORSTMAN, L. Cattle warts, bovine papillomatosis, Purdue, Purdue University. Cooperative Extension Service of Purdue University 1999.

MOURA, J.W. *et al*. Chromosome aberrations in cattle raised on bracken fern pasture. *Experientia*, Basel, v.44, n.9, p.785-788, Sep. 1988.

MUNGER, K. E HOWLEY, P.M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 89:213-228, 2002.

MUNOZ, N. Human papillomavírus and câncer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 19: 1-5, 2000.

NAGATA, T.; AOSHI, T.; UUCHUMA, M.; SUZUKI, M.; KOIDE, Y. Cytotoxic T-lymphocyte, and helper T- lymphocyte oriented DNA vaccination. *DNA and Cell Biology*, Philadelphia, v.23, n.2, p.93-106, 2004.

NASIR, L. & CAMPO, M.S. Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. *Vet Dermatol*. 19(5):243-54, 2008.

NASIR, L. & REID, S.W.J Bovine papillomaviral gene expression in equine sarcoid tumours. *Virus Res*. 61 (2): 171-175, 1999.

MCBRIDE, A. A., J. C. BYRNE, AND P. M. HOWLEY. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J. Biol. Chem*. 266:18411–18414, 1991.

NICHOLLS, P.K. E STANLEY, M.A. The immunology of animal papillomaviruses. *Vet Immunol Immunopathol* 73:101-127, 2000.

NOWLING, T.; DESLER, M.; KUSZYNSKI, C. & RIZZINO, A. Transfection of embryonal carcinoma cells at high efficiency using liposome-mediated transfection. *Mol Reprod Dev.* 63(3):309-17, 2002.

O'BRIEN, P.M.; CAMPO, M.S.. Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins. *Virus research*, v. 88, p. 103-118, 2002.

OGAWA, T.; TOMITA, Y.; OKADA, M.; SHINOZAKI, K.; KUBONOYA, H.; KAIHO, I. E SHIRASAWA, H. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. *J Gen Virology* 85:2191-2197, 2004.

OLIVEIRA, S. C.; HARMS, J. S.; RECH, E. L.; RODART, R. S.; BOCCA, A. L.; GOES, A. M.; SPLITTER, G. A. The role of T cell subsets and cytokines in the regulation of an intracellulaar bacterial infection. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v.32, p.77-84, 1998.

OLSON, C.; PAMUKCU, A.M.; BROBST, D.F.; KOWALCZYK, T.; SATTER, E.J.; PRICE, J.M.. A URINARY BLADDER TUMOR INDUCED BY BOVINE CUTANEOUS PAPILLOMA AGENT. *CANCER RESEARCH*, V. 19, P. 779-782, 1959.

PACHAURI, S.P.; SHARMA, U.K.; JOSHI, H.C. Note on pathological studies on the urinary bladder tumours of cattle with chronic haematuria. *Int. J. Anim. Sci.*, Sonapat, v.51, n.9, p.898 – 900, Sep. 1981.

PATIL, S. D.; RHODES, D. G. & BURGESS, D. J. Biophysical characterization of anionic lipoplexes. *Biochin Biophys Acta.* 1171:1-11, 2005.

PEREIRA, R., HITZEROTH, I.I., RYBICKI, E.P. *Arch Virol* 154:187–197, 2009.

PERTMER, T. M., M. D. EISENBRAUN, D. MCCABE, S. K. PRAYAGA, D. H. FULLER, AND J. R. HAYNES. Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* 13:1427–1430, 1995.

POKOJ, S.A., LAUER, I. A., FÖTISCH, K. A., HIMLYB, M., MARI, A.C, ENRIQUE, E.D., MIGUEL-MONCIN, M.D.M., LIDHOLM, J.F., VIETHS, S.A., SCHEURER S.A. *Pichia pastoris* is superior to *E. coli* for the production of recombinant allergenic non-specific lipid-transfer proteins. *Protein Expression and Purification* 69 68–75, 2010.

POLACK, E.W. Toxicidade da *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn no Estado do Paraná. 1990. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1990.

PORGADOR A., IRVINE K.R., IWASAKI A., BARBER B.H., RESTIFO N.P. AND GERMAIN R.N. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J. Exp. Med.* 188: 1075–1082, 1998.

PRUD'HOMME, G. J. DNA vaccination against tumor. *The Journal of Gene Medicine*, 7: 3-17, 2005.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. Clínica veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, suínos, caprinos e equinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1735p, 2000.

RAINCZUK, A.; SMOOKER, P.M.; KEDZIERSKI, L.; BLACK, C.G.; COPPEL, R.L.; SPITHILL, T.W. The protective efficacy of MSP4/5 against lethal *Plasmodium chabaudi* adami challenge is dependent on the type of DNA vaccine vector and vaccination protocol. *Vaccine*, Kidlington, v.21, p.3030-3042, 2003.

RAJENDRAN, M.P. *et al.* Experimental production of enzootic bovine haematuria with braken fern. *Indian Vet. J.*, Bangalore, n.60, p.173-178, Mar. 1983.

RAMSHAW, I. A.; FORDHAM, S. A.; BERNARD, C. A.; MAGUIRE, D.; COWDEN, W.B.; WILLENBORG, D. O. DNA vaccine for the treatment of autoimmune disease. *Immunology and Cell Biology*, London, v.75, p.409-413, 1997.

REDDY, A.L.; FIALKOW, P.J. Papillomas induced by initiation-promotion differ from those induced by carcinogen alone. *Nature*, London, v.304, n.7, p.69-71, Jul. 1983.

REN, S.; LI, M.; SMITH, J. M.; DETOLLA, L. J.; FURTH, P.A. Low-volume jet injection for intradermal immunization in rabbits. *BMC Biotechnology*, Maryland, v.2, n.10, p.1- 6, 2002.

ROBINSON, H.L. Nucleic acid vaccines: an overview. *Vaccine*, Kidlington, v.15, n.8, p.785-787, 1997.

RODEN, R.B.S.; WEISSINGER, E.M.; HENDERSON, D.W.; BOOY, F.; KIRNBAUER, R.; MUSHINSKI, J.F.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Neutralization of Bovine Papillomavirus by Antibodies to L1 and L2 Capsid Proteins. *Journal of Virology* v. 68, n. 11, p. 7570 - 7574, 1994.

RODEN, RBS; GREENSTONE, HL; KIRNBAUER, R; BOOY, FP; JESSIE, J; LOWY, DR E SCHILLER, JT. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavírus type 16 virion pseudotype. *J Virol* 70: 5875-5883, 1996.

RODEN, R.B.S.; YUTZY, W.H.; FALLON, R.; INGLIS, S.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Minor capsid protein of human genital papillomaviruses contains subdominant, cross-neutralizing epitopes. *Virology* v. 270, n.2, p.254 – 257, 2000.

ROMOREN. K.; FJELD, X. T. L.; POLEO, A. B. S.; SMISTAD, G.; THU, B. J. & EVENSEN, O. Transfections efficiency and cytotoxicity of cationic liposomes in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mukiss*) gill cells. *Bichin Biophys Acta*. 1717:50-57, 2005.

ROSE RC, BONNEZ W, DA RIN C, MCCANCE DJ, REICHMAN RC. Sero- logical differentiation of human papillomavirus types 11, 16 and 18 using recombinant virus-like particles. *J Gen Virol* 1994;75:2445– 9.

ROSENBERGER, G. Enfermedades de los bovinos. Buenos Aires: Hemisfério Sur, v.1, 1989.

SANTOS, R.C.S. *et al.* Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: on experimental model. J. Gen. Virol., Reading, v.79, n.9, p.2127-2135, Sep. 1998.

SASAKI S, TAKESHITA F, XIN KQ, ISHII N, OKUDA K. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines. Methods. Nov; 31(3):243-54, 2003.

SARZOTTI M, ROBBINS DS, HOFFMAN PM. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. Science. Mar 22;271(5256):1726-8, 1996.

SCHILLER, J. E LOWY, D.R. Papillomavirus-like particle based vaccines: cervical cancer and beyond. Expert Opin Biol Ther 1:571-581, 2001.

SCHIMIDT, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. Appl Microbiol Biotechnol. 65: 363-372, 2004.

SCHRIJVER, R.S.; LANGEDIJK, J.P.; KEIL, G.M.; MIDDEL, W.G.; MARIS-VELDHUIS, M.; VAN OIRSCHOT, J.T.; RIJSEWIJK, F.A. 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, 1997.

SEO, S.H., WANG, L., SMITH, R. AND COLLISSON, E.W. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of IB virus nucleocapsid induces CTLs and protects chickens from acute infection. Journal of Virology, 71, 7889–7894, 1997.

SIEGRIST, C.A. Potencial advantages and risks of nucleic acid vaccines for infant immunization. Vaccine, Kidlington, v.15, n.8, p.798-800, 1997.

SLEEP, D.; BELFIELD, G. P.; BALANCE, D. J.; STEVEN, J. JONES, S.; EVANS, L. R. MOIR, P. D. & GOODEY, A. R. *Saccharomycyces cerevisiae* strains that overexpress heterologous proteins. Biotechnology. 9:183-187, 1991.

SNADEEP, K.; TRIPATHY, S.K.; SVENSSON, E.C.; BLACK, H.B.; GOLDWASSER, E.; MARAGALITH, M.; HOBART, P.M.; LEIDEN, J.M. Long-term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. Genectics, Pittsburgh, v.93, p.10876-10880, 1996.

SMITH, B.P. Tratado de Medicina Interna de Grandes Animais. São Paulo: Manole, v.2, 1994.

STEVENSON FK. DNA vaccines and adjuvants. Immunol Rev. Jun;199:5-8, 2004.

STOCCO DOS SANTOS, R.C.; LINDESAY, C.J.; FERRAZ, O.P. *et al.* Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. J. Ger. Virology 79: 1-9, 1998.

STRAIGHT, S.W.; HERMAN, B.; MCCANCE. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. J. Virol. 69:3185-92, 1995.

SUNDARAM, P.; TIGELAAR, R.E. E BRANDSMA, J.L. Intracutaneous vaccination of rabbits with the cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) L1 gene protects against virus challenge. *Vaccine* 15:664-671, 1997.

SUZICH, J.A.; GHIM, S.J.; PALMER-HILL F.J.; WHITE, W.I.; TAMURA, J.K.; BELL, J.A.; NEWSOME, J.A.; JENSON, A.B. E SCHLEGEL, R. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:11553-11557, 1995.

THOMSEN, P.; VAN DEURS, B.; NORRILD, B.; KAYSER, L. The HPV16 E5 oncogene inhibits endocytic trafficking. *Oncogene* 19, 6023–6032, 2000.

TINDLE, R.W.. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Current Opinion in Immunology*, v. 8, p. 643-650, 1996.

TINDLE, R.W. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 643-650, 2002.

TORRONTGUI, B.O AND REID, S.J. Clinical and pathological epidemiology of the equine sarcoid in a referral population. *Equine Vet Educ* 6, 85–88, 1994.

TRUS, B. L., R. B. RODEN, H. L. GREENSTONE, M. VRHEL, J. T. SCHILLER, AND F. P. BOOY. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 4:413–420, 1997.

TUDOR D, DUBUQUOY C, GABORIAU V, LEFEVRE F, CHARLEY B, RIFFAULT S. TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines. *Vaccine*. Jan 26; 23(10):1258-64, 2005.

UCHIJIMA, M.; YOSHIDA, A.; NAGATA, T.; KOIDE, Y. Optimization of codon usage of plasmid DNA vaccine is required for the effective MHC class I-restrict T cell responses against an intracellular bacterium. *Journal Immunology*, Bethesda, v.161, p.5594-5599, 1998.

Ulmer, J. B.; Donnelly, J. J.; Parker, S. E.; Podes, G. H.; Felgner, P. L.; Dwarki, V. J.; Gromkowski, S. H.; Randall Deck, R.; Dewitt, C. M.; Friedman, A.; Hawe, L.A.; Leander, K. R.; Martinez, D.; Perry, H. C.; Shiver, J. W.; Montgomery, D. L.; Liu, M. A., Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, New York, v.259, p.1745-1749, 1993.

ULMER, J. B.; DECK, R. R.; DEWITT, C. M.; FU, T. M.; DONNELLY, J. J.; CAULFIELD, M. J.; LIU, M. A. Expression of a viral protein by muscle cells in vivo induces protective cell-mediated immunity. *Vaccine*, Kidlington, v.15, n.8, p.839-841, 1997.

VANROMPAY, D.; COX, E.; VANDENBUSSCHE, F.; VOLCKAERT, G.; GODDEERIS, B. Protection of turkeys against *Clamidia psitaci* challenge by gene gun-based DNA immunizations. *Vaccine*, Kidlington, v.17, p.2628-2635, 1999.

VATAKIS DN, KOH YT, McMILLAN M. CD4+ T cell epitope affinity to MHC II influences the magnitude of CTL responses elicited by DNA epitope vaccines. *Vaccine*. Apr 8;23(20):2639-46, 2005.

VERMA, R.; BOLETI, E. & GEORGE, A. J. T. Antibody engineering: comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J. Immunol Methods*. 216:165-181, 1998.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks – 2003. *Nature Biotech*. 21 (8): 865 – 870, 2003.

WANG, R.; DOOLAN, D. L.; LE, T. P.; HEDSTROM, R. C.; COONAN, K. M.; CHAROENVIT, Y. Induction of antigen specific cytotoxic T lymphocytes in humans by malaria DNA vaccine. *Science*, New York, v.282, p.476-480, 1998.

WANG, S.; FARFAN-ARRIBAS, D. J.; SHEN, S.; CHOU, T.H.W.; HIRSCH, A.; HE, F.; LU, S. Relative contributions of codon usage, promotor efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine*, Kidlington, v.24, n.21, p.4531- 4540, 2005.

WHALEN, R.G. DNA vaccines for emerging infectious diseases: what if? *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v.2, n.3, p.168-175, 1996.

WAINE, G.J.; MCMANUS, D.P. Nucleic Acids: Vaccines of the future. *Parasitology Today*, California, v.11, n.3, p.113-116, 1995.

WOLFF, J. A.; MALONE, R. W.; WILLIAMS, P.; CHONG, W.; ACSADI, G.; JANI, A.; FELGHER, P. L., Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, New York, v.247, p.1465-1468, 1990.

WOSIACKI, S.R.; BARREIRO, M.A.B.; AALFIERI, A.F.; ALFIERI A.A. Semi-nested PCR for detection of bovine papillomavirus type 2 in urinary bladder and whole blood of cattle from enzootic hematuria. *Journal of Virological Methods*, v. 126, p. 215-219, 2005.

YANG, L., LI R., MOHR I.J., CLARK R. E BOTCHAN M.R., Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. *Nature* 353(6345): 628-32, 1991.

YOUN JW, PARK SH, CHO JH, SUNG YC. Optimal induction of T-cell responses against hepatitis C virus E2 by antigen engineering in DNA immunization. *J Virol*. Nov;77(21):11596-602, 2003.

YOSHIDA, A.; NAGATA, T.; UCHIJIMA, M.; HIGASHI, T.; KOIDE, Y. Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses. *Vaccine*, Kidlington, v.18, p.1725–1729, 2000.

ZHANG, X.; DIVANGAHI, M.; NGAI, P.; SANTOSUOSSO, M.; MILLAR, J.; ZGANIAZ, A.; WANG, J.; BRAMSON, J.; XING, Z. Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: Enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene. *Vaccine*, Kidlington, v.25, n.7, p.1342-1352, 2007.

ZIMMERMANN H, KOH C.H., DEGENKOLBE R, O'CONNOR M.J., MULLER A., STEGER G., CHEN J.J., LUI Y., ANDROPHY E. E BERNARD H.U. 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, 2000.

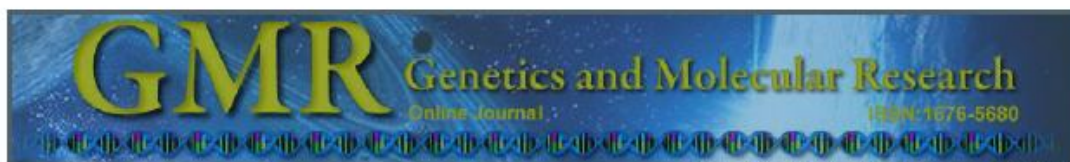
ZUR HAUSEN, H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. In "Current Topics in Microbiology and Immunology," Vol. 186, pp. 131–156, 1994.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1288 (2), F55–F78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Viruses in human cancers. *Eur. J. Cancer* 35, 1174–1181, 1999.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2:342-350, 2002.

**APÊNDICE A – Carta de aceite para publicação do artigo na
Genetics and Molecular Research (GMR).**



Ribeirão Preto, 25 de março de 2013.

Prezados Autores,

Informamos que o artigo "Development of a DNA-based vaccine strategy against bovine papillomavirus infection, involving the E5 or L2 gene", GMR 2718, de autoria E.G. Lima, R.C. Lira, A.L.S. Jesus, R. Dhalia and A.C. Freitas, foi aceito para publicação na *Genetics and Molecular Research (GMR)*.

Aproveitamos a oportunidade para informar que a GMR está indexada em 74 bases de dados, entre elas: Index Medicus, PubMed, Medline e ISI. E tem fator de impacto 1,184, segundo JCR - junho 2012.

Atenciosamente,

Francine Muniz
Coordenadora editorial (Mtb 44.300)
Genetics and Molecular Research
www.funpecrp.com.br/gmr
Tel. (16) 3620-1251 – Fax. (16) 3621-1991

ANEXO A – Artigo Submetido e Aceito pela Revista Genetics and Molecular Research (GMR)

Short Communication for Genetics and Molecular Research

Title: Development of a vaccinal strategy based on genetics immunization against bovine papillomavirus infection using E5 or L2 genes

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

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

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE, Brasil.

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 from diverse organisms that may progress to cancer under suitable conditions. Bovine papillomavirus (BPV) is related to urinary bladder cancer and cancer of the upper gastrointestinal tract. Furthermore, BPV1 and 2 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 a strong humoral and cellular immune response. In this work, we proposed the development of two vaccine constructs for the control of diseases caused by BPV. The first strategy is prophylactic based on the L2 gene. The second one is therapeutic based on the E5 gene. Vaccine constructs were obtained and evaluated *in vitro* in mammalian cells. The results show the expression and respective production of the E5 and L2 viral proteins. These results confirm the functionality of the vaccine constructs in mammalian cells. This is the first step in the development of a vaccine strategy based on DNA vaccine 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 main highlights of the Brazilian agribusiness on the international stage. However, some diseases have been causing considerable damage to this sector. Among them are diseases caused by papillomavirus: papillomatosis, and cancer. The 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 functions both in male and in female cattle (Campo, 2003). Besides the benign tumors there is the possibility, under action of co-factors, of the progression to cancer in the upper gastrointestinal tract or urinary bladder that usually leads to 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). At the moment, there is no vaccine or effective treatment for the control of papillomatosis and cancer. There are few BPV treatments available with variable levels of success.

Several strategies have been used for the development of different types of vaccines (Kim et al., 2008). In this scenario, DNA vaccines have been considered because they are able to stimulate effective CTL and antibody responses by delivering foreign antigen to APCs that stimulate CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Naked DNA plasmid vaccines offer a number of advantages when compared to classical vaccines (Gurunathan et al., 2000). The time of production is fast, the cost of large scale production is considerably lower and the commercialization does not require a

network of refrigeration because these vaccines are stable at room temperature (Glenting and Wessles, 2005).

The E5 protein is the major BPV oncoprotein acting on the disturbance of the mechanisms of growth suppression and cell cycle control. Additionally, it interacts with growth factor receptors, activating cellular proliferation (Venuti et al., 2011). The L2 protein is the minor viral capsid protein, but is extremely necessary for papillomavirus infection. It is responsible for binding to a secondary viral receptor, facilitating the exit of the endosome and the delivery of the viral genome within the nucleus (Karanam et al., 2009).

Thus, the development of a prophylactic and therapeutic vaccine for BPV infection has become a key issue. Thus, this study aimed to evaluate the construction of vaccine vectors based on BPV1 E5 and L2 genes and the evaluation of their potential for expression in mammalian cells.

MATERIALS AND METHODS

BPV1 E5 gene was codon-optimized for expression in mammalian cells and then synthesized by Epoch Biolabs Company (Texas, USA). Besides the codon optimization, it was necessary to interrupt the transforming activity of this gene, since the study aimed to construct a DNA vaccine to be applied in genetic immunization. Therefore, glutamine 17 was replaced by glycine, as it is known that this substitution extinguishes the biological activity of the E5 protein (Sparkowski et al., 1994). The L2 gene was amplified with polymerase chain reaction (PCR) from the complete BPV1 genome and cloned into pGEM-T Easy vector (Promega, Wisconsin, USA). In both genes, AU1 epitope was inserted at the N-terminal portion in order to facilitate the 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 with PCR, enzyme digestion, and 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), 1% L-glutamine (Sigma, Sao Paulo, Brazil). Cells at approximately 80% confluence were transfected with the pCIE5sint and pCIL2 constructs and empty pCI-neo vector (negative control) using the Polyfect[®] transfection reagent (Qiagen, Sao Paulo, Brazil) according to the instructions suggested by manufacturer. After 1 hour of incubation, the transfection reagent was removed and complete DMEM was added. Cells were incubated for 48 hours at 37°C, 5% CO₂. After this period, the cells were processed for evaluating the expression of viral genes by RT-PCR and production of viral proteins by Western blot.

To evaluate the transcription of E5 and L2 genes, it was performed RT-PCR from the transfected HEK 293 cells. Total RNA was extracted using RNeasy RNA isolation kit (Qiagen). The synthesis of cDNA was performed using the ImProm[®]-II Reverse Transcription System (Promega) following the manufacturer's

recommendations. To eliminate the possibility of contamination of the RNA samples with genomic DNA, the material was treated with DNase I (Promega).

Protein expression was evaluated by Western blot assays with protein extracts of the transfected cells. The protein extracts of the transfected cells was 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 membrane (Millipore, São Paulo, Brazil). The membrane was blocked in 5% nonfat dry milk, incubated for 1 h with monoclonal antibody anti-AU1 (Covance, New Jersey, USA) (1:500) under agitation and washed 3 times with PBS 0.05% Tween 20. Then, the membrane was incubated for 1 h with antibody anti-mouse IgG HRP conjugated (1:5000) (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA) and washed with PBS 0.05% Tween 20. The protein detection was performed using the ECL chemiluminescent kit (Amersham, UK).

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

RESULTS AND DISCUSSION

Particularly to BPV, the production of an effective, safe and low cost vaccine may lead to a large reduction in the incidence and mortality of animals with BPV infection. This virus is also an excellent model for human papillomavirus vaccination studies. In this sense, 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 the expression vector and evaluated for *in vitro* gene expression and consequent production of viral proteins.

The evaluation of the viral genes expression 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 cells not transfected. In this assay, we observed the amplification of fragments of 175 bp, referring to the E5 gene, and 500 bp, referring to an internal fragment of the L2 gene (Figure 1). The reaction of samples without the reverse transcriptase enzyme were negative indicating that no contamination with genomic DNA.

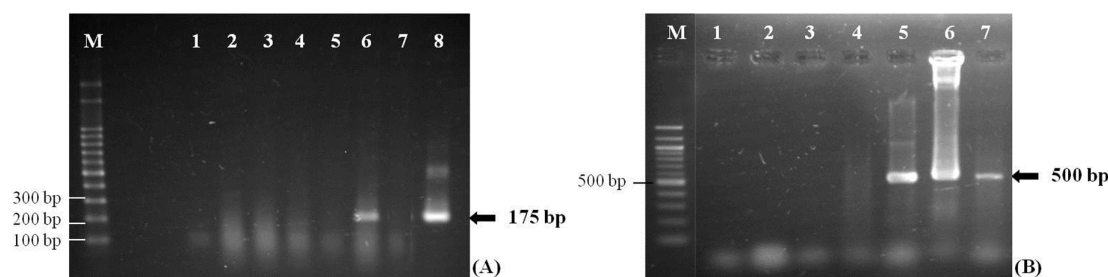


Figure 1. RT-PCR detection of the viral genes transcription in the transfected cells using the gene-specific primers. **A.** Analysis of E5 gene transcription showing a fragment of 175 bp. Lane M = 100-bp DNA ladder (Invitrogen); Lane 1 = control reaction (without DNA); Lanes 2, 4 and 6 = respectively, 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.

The protein extract of the transfected cells was assessed for the production of the viral proteins by Western blot. Only in the cells transfected with pCIE5sint and pCIL2 constructs, the assay detected a band of approximately 10 and 72 kDa, the expected sizes for BPV1 E5 and L2 proteins, respectively (Figure 2). It is noteworthy that the E5 protein was detected only after immunoprecipitation step. Through this step, it was possible to solubilize the biomembranes and detach the E5 protein from the cell membranes, resulting in a higher concentration of the antigens in the extract (Disbrow et al., 2003).

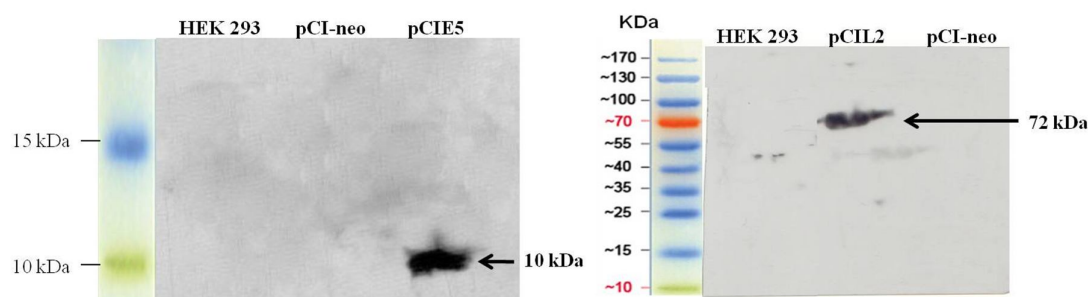


Figure 2. Western blot detection of E5 and L2 proteins produced in transfected cells. The proteins from only **HEK 293** cells, cells transfected with the empty **pCI-neo** vector and cells transfected with **pCIE5sint** and **pCIL2** were analyzed using antibody anti-AU1. A band of approximately 10 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 cross-immune reaction, i.e. L2 can confer immune protection against a range of papillomavirus, including HPV (Karanam et al., 2009; Jagu et al., 2011). In the case of E5, the bet on this gene as a therapeutic vaccine against papillomavirus is still underexplored. The BPV E5 protein is related to cell transformation and its expression occurs both early and during the viral infection, modifying the cellular response to growth factors and blocking the expression of MHC (major histocompatibility complex) on the cell surface, making this gene attractive for use as DNA vaccine (Borzacchiello and Roperto, 2008; Venuti et al., 2011).

The results here presented show the expression and respective production of E5 and L2 viral proteins. These results confirm the functionality of the vaccine constructs in mammalian cells. This is the first step in the development of a vaccine strategy based on DNA vaccine for the control and/or treatment of diseases caused by BPV.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank 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 support in the experiment.

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, Cowser 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.