

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

THAIS MOREIRA ALEXANDRE DA SILVA

CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO NÃO COMERCIAL
CONTENDO OS GENES L1 E QUIMERAS DE L1-E5 DO
PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPO 1

RECIFE
2017

THAIS MOREIRA ALEXANDRE DA SILVA

**CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO NÃO COMERCIAL
CONTENDO OS GENES L1 E QUIMERAS DE L1-E5 DO
PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPO 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Dr. Filipe Colaço Mariz

RECIFE

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Thaís Moreira Alexandre da

Construção de vetores de expressão não comercial contendo os genes L1 e quimeras de L1-E5 do Papilomavírus bovino Tipo 1/ Thaís Moreira Alexandre da Silva- 2017.

55 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas

Coorientador: Filipe Colaço Mariz

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Recife, 2017.

Inclui referências e anexos

1. Papilomavírus 2. Leishmania 3. Clonagem I. Freitas, Antonio Carlos (orient.) II. Mariz, Filipe Colaço (coorient.) III. Título

579.2445

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-074

THAIS MOREIRA ALEXANDRE DA SILVA

**CONSTRUÇÃO DE VETORES DE EXPRESSÃO NÃO COMERCIAL
CONTENDO OS GENES L1 E QUIMERAS DE L1-E5 DO
PAPILOMAVÍRUS BOVINO TIPO 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: ____/____/____

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Antonio Carlos de Freitas
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Will de Barros Pita
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Christian Robson de Souza Reis
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Aggeu Magalhães

Recife, 30 de agosto de 2017.

Dedico à minha mãe por sempre ter acreditado em mim e por nunca ter deixado de acreditar que tudo daria certo no final.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus, por ter me guiado durante todo o mestrado, por ter me dado forças e coragem para seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis e não ter me deixado desistir nunca;

Aos meus pais, Edna e Valdemar, por todo esforço e dedicação, sem eles nada disso seria possível. À minha irmã, Patrícia, que mesmo com nossas diferenças sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me ajudando quando precisava;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Carlos de Freitas, pela oportunidade dada desde a graduação, pelo apoio, confiança, disponibilidade e por todo conhecimento compartilhado ao longo desse tempo.

Ao Dr. Christian Reis pela gentileza, solidariedade e pelas sugestões dadas para melhoria desse trabalho; em seu nome, agradeço também ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães onde parte dos experimentos foi desenvolvida.

À Filipe Mariz, pela co-orientação e contribuições dadas no decorrer dos experimentos.

Aos colegas do LEMTE, em especial à Anna Jéssica e André Luiz, pela prestatividade e ajuda em diversos momentos; à Alline, pela paciência em ouvir minhas lamentações e por compartilhar momentos de desesperos e de alegrias diariamente e; à Gustavo, que foi de fundamental importância para o andamento dos experimentos, sempre muito solícito e prestativo, me ajudou em momentos cruciais.

Aos colegas do programa de pós-graduação em Biotecnologia Industrial, pelas aflições e alegrias compartilhadas durante todo o período do curso.

Aos amigos mais próximos, que sempre estiveram presentes no decorrer do trabalho, me incentivando a continuar e a persistir.

“Aponta pra fé e rema”

Los Hermanos

RESUMO

O papilomavírus bovino (BPV) é um vírus altamente disseminado no mundo capaz de infectar rebanhos bovinos e provocar a papilomatose bovina, infecção que debilita a saúde do animal e pode resultar em morte. O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, tendo grande destaque na exportação de carne bovina e na produção de leite, contudo a falta de dados precisos sobre a doença ainda são escassos o que dificulta o desenvolvimento de medidas de controle da infecção. Além disso, não existe uma vacina ou tratamento efetivo para papilomatose bovina. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo a produção de cassetes para expressão de diferentes antígenos de BPV1 em linhagens recombinantes de *Leishmania tarentolae* baseadas em um vetor de expressão não comercial. As quimeras foram construídas mediante PCR de fusão a partir do gene L1 selvagem clonado previamente no vetor de expressão pPGKΔ3. Através de eletroforese em gel de agarose foi observado a construção de fragmentos com tamanho aproximado de 1500 pb, indicando que houve a fusão dos dois fragmentos produzindo uma quimera no tamanho esperado. As construções foram clonadas no vetor pGEM-T Easy e a correta construção dos insertos foi confirmada por digestão e análise de sequenciamento de DNA. Posteriormente, as quimeras foram subclonadas no vetor de expressão pSPααNEO, sendo a clonagem novamente confirmada mediante digestão enzimática. Os resultados demonstram que os cassetes de expressão foram corretamente construídos e podem ser utilizados em estudos futuros de avaliação da expressão proteica das quimeras no sistema de *Leishmania tarentolae*.

Palavras-chave: BPV. PCR de fusão. Loops. Quimeras. Clonagem

ABSTRACT

The bovine papillomavirus (BPV) is a highly disseminated virus in the world capable of infecting cattle herds and causing the bovine papillomatosis infection that weakens the health and can result in death of those animals. Brazil has the largest commercial herd in the world, with great emphasis on the export of beef and milk production, but the lack of accurate data on the disease are scarce which makes difficult the development of control measures for the disease. The present work aimed at the production of cassettes for the expression of different BPV1 antigens in recombinant *Leishmania tarentolae* lines based on a non-commercial expression vector. The chimeras were constructed using fusion PCR from wild L1 gene previously cloned into the expression vector pPGK Δ 3. Using agarose gel electrophoresis it was observed construction fragments with approximate size 1500 bp, indicating that there was a fusion of the two fragments producing a chimera with the expected size. The constructions were cloned into pGEM-T Easy vector and the correct construction of the inserts was confirmed by digestion and DNA sequence analysis. Later, the chimeras were subcloned into the pSP α NEO expression vector, and the cloning was again confirmed by enzymatic digestion. The results demonstrate that the expression cassettes were correctly constructed and could be used in future studies evaluating the protein expression of the chimeras in the *Leishmania tarentolae* system.

Key-words: BPV. Phusion PCR. Loops. Chimeras. Cloning

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA	Página
Figura 1 - Estrutura dos papilomavírus	11
Figura 2 - Organização genômica do BPV-1.	13
Figura 3 - Representação linear do genoma de BPV1 e das atividades bioquímicas das proteínas virais.	15
Figura 4 - Estrutura do monômero de L1 do HPV-16 incluindo os resíduos de 20-474.	17
Figura 5 - Visão esquemática da papilomatose bovina em diferentes locais na vaca.	20
MATERIAIS E MÉTODOS	
Figura 6 - Desenho esquemático das etapas da PCR de fusão.	29
Figura 7 - Desenho esquemático dos genes de estudo	30
Figura 8 - Mapa do vetor pGEM-T Easy (Promega)	31
Figura 9 - Vetor de expressão pSP α Neo resultante da fusão do vetor pSP72 ao cassete α Neo	33
Figura 10 - Mapa do vetor pSP72 (Promega)	33
RESULTADOS	
Figura 11 - Gel representativo da primeira etapa da PCR de fusão	35
Figura 12 - Gel representativo das construções obtidas após a segunda etapa da PCR de fusão	36
Figura 13 - Gel representativo da digestão quimeras no vetor pGEM-T Easy com <i>Bam</i> HI e <i>Kpn</i> I	37

Figura 14	- Gel representativo de digestões enzimáticas do vetor de expressão pSPααNEO com as enzimas BamHI e KpnI.	39
Figura 15	- Gel representativo da digestão das quimeras no vetor de expressão com as enzimas BamHI e KpnI.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Sequência de primers utilizadas na PCR de fusão	28
Tabela 2	- Identificação das mutações presentes nas sequências quiméricas	38

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
BPV	Papilomavírus bovino
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CRPV	Papilomavírus do coelho
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
DH10β	Linhagem de <i>Escherichia coli</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HPV	Papilomavírus humano
IFN- γ	Interferon gama
IPTG	Isopropil-β-D-galactosídeo
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Meio Luria-Bertani
LCR	Longa região de controle (<i>Long Region Control</i>)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MM	Marcador molecular
NaCl	Cloreto de sódio
ORF	Quadro aberto de leitura (<i>Open Reading Frame</i>)
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PV	Papilomavírus
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
VLP	Partículas semelhantes ao vírus (<i>Virus-like particles</i>)
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Papilomavírus bovino	11
2.2 Estrutura e Organização do Genoma do BPV	13
2.2.1 <i>Proteína L1</i>	15
2.2.2 <i>Oncoproteína E5</i>	18
2.3 Papilomatose Bovina	18
2.4 Estratégia vacinal	21
2.5 Sistemas de expressão heterólogos	23
2.6 Sistemas baseados em <i>Leishmania tarentolae</i>	24
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Construção das quimeras de L1-E5 por PCR de fusão	28
4.2 Clonagem no vetor pGEM-T Easy	30
4.3 Clonagem nos vetores de expressão pSPααNeo	32
5 RESULTADOS	35
5.1 Construção dos genes candidatos baseados em L1	35
5.2 Clonagem no pGEM-T Easy	36
5.3 Análise do Sequenciamento da Clonagem em pGEM-T Easy	37
5.4 Subclonagem no vetor de expressão pSPααNEO	38
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÕES	43
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

9 ANEXOS	51
-----------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo Papilomavírus bovino (BPV) está amplamente distribuída pelo mundo, sendo relatada em todos os cinco continentes. Quando persistente, a infecção debilita a saúde do animal e pode levar a morte, provocando consequentemente a diminuição da produtividade dos rebanhos (MAEDA et al, 2007). Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2014), o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, sendo o maior exportador de carne bovina e sexto maior produtor de leite. Apesar disso, dados epidemiológicos precisos sobre a papilomatose bovina são escassos, o que acarreta a subnotificação do número de casos (COMENALE, 2012), dificulta o desenvolvimento de medidas para o controle da doença e potencializa as perdas econômicas para os criadores.

Por se tratar de uma infecção viral, é de grande valor o desenvolvimento de abordagens imunizantes, seja profilático ou terapêutico, para o controle da papilomatose bovina. Além do suporte sobre a pecuária, os estudos relacionados à infecção pelo BPV são úteis para a saúde humana uma vez que o bovino serve como modelo experimental natural, melhor que o modelo murino, para o estudo da infecção pelo HPV em humanos (MAEDA et al, 2007; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008).

Baseado nisso, o desenvolvimento de uma nova plataforma biotecnológica para controle do papilomavírus bovino utilizando a *Leishmania tarentolae* como sistema de expressão, permitiria a produção de partículas semelhantes ao vírus (*virus-like particles* – VLPs) do BPV que serviriam como uma estratégia profilática para a doença. A utilização de VLPs quiméricas com base nas proteínas do capsídeo viral L1–L2 e L1-E5, sendo E5 a principal oncoproteína viral expressa durante o início do desenvolvimento das lesões, apresentaram a capacidade de conferir, respectivamente, proteção cruzada contra os diferentes tipos de BPV e, proteção profilática e terapêutica aos animais. (WAKABAYASHI et al, 2002; SCHELLENBACHER et al, 2009; SHARMA et al, 2012).

Quando comparado com as plataformas das vacinas anti-HPV utilizando leveduras e células de insetos, o sistema baseado em *L. tarentolae* apresenta um potencial para produzir os antígenos a um menor custo, uma vez que as células de

L. tarentolae apresentam elevada taxa de crescimento em meios de cultivo mais simples, alto rendimento de produção de proteínas recombinantes, além da facilidade de produção das mesmas (BASILE; PETICCA, 2009; RAYMOND et al, 2011). Explorado como um vetor vacinal vivo contra a leishmaniose visceral e a imunodeficiência adquirida provocada pelo HIV, a *L. tarentolae* serviria também como vetor para terapia ao expressar a proteína E5 do BPV (BOLHASSANI; ZAHEDIFARD, 2012; BRETON et al, 2005; MIZBANI et al, 2010). Por isso, o sistema de *L. tarentolae* seria um candidato atrativo para o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas contra as doenças relacionadas ao papilomavírus.

O presente trabalho tem como objetivo a produção de cassetes para expressão de diferentes antígenos de BPV1 - resultantes da fusão do gene L1 com epítomos de E5 - em linhagens recombinantes de *Leishmania tarentolae* baseadas em um vetor de expressão não comercial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Papilomavírus bovino

Vírus da família *Papillomaviridae*, os papilomavírus (PVs) compõem um grupo bastante heterogêneo de vírus, estando associado a diferentes tipos de lesões epiteliais específicas (de VILLIERS et al., 2004). São vírus pequenos, não envelopados que medem de 45-55 nm de diâmetro e apresentam um DNA circular de fita dupla com aproximadamente 8000 nucleotídeos complexados com histonas celulares (CORTEGGIO et al, 2013). O capsídeo é formado por 72 subunidades denominadas capsômeros ou pentâmeros apresentando uma conformação icosaédrica, que confere uma morfologia esférica (Figura 1) quando observado por meio de microscopia eletrônica (de VILLIERS et al., 2004).

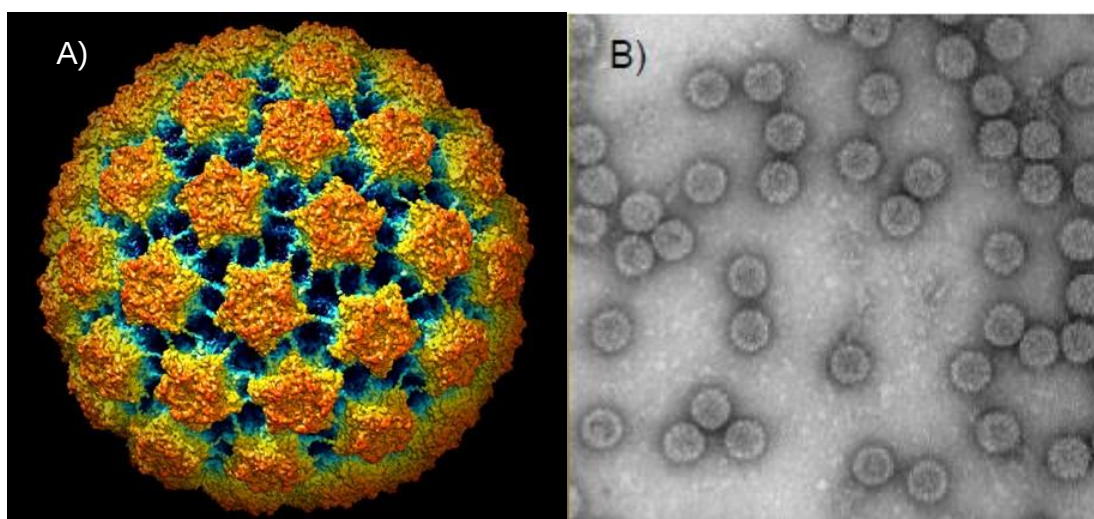


Figura 1. Estrutura do papilomavírus. A) Representação esquemática da estrutura do capsídeo dos papilomavírus (Fonte: Wolf et al., 2010). B) Eletromicrografia de papilomavírus bovino (Fonte: Garcea e Chen, 2007).

Os PVs infectam tanto os humanos quanto diferentes espécies animais, podendo causar lesões hiperproliferativas (verrugas, papilomas ou condilomas) benignas nas mucosas e tecidos cutâneos (CORTEGGIO et al, 2013). Essas lesões tendem a regressão causada pela ação de uma resposta imunológica celular do organismo do hospedeiro contra os antígenos virais (O'BRIEN; CAMPO, 2003). Sob determinadas circunstâncias, a infecção induzida por tipos específicos de PV conduz a transformação das lesões benignas em cânceres malignos e, portanto, os PVs são considerados agentes oncogênicos (CORTEGGIO et al, 2013).

Os papilomavírus são classificados nos diferentes gêneros a partir da análise da ORF L1 altamente conservada, de maneira que um PV é considerado um tipo diferente se a L1 apresentar menos que 90% de similaridade com outro PV. Os tipos de PV são agrupados em gêneros com os membros do gênero apresentando entre si similaridade maior que 60% (BERNARD et al., 2010). Os PVs pertencentes a um mesmo gênero geralmente possuem hospedeiros, localização e características comportamentais semelhantes. Atualmente, mais de 280 tipos de papilomavírus foram identificados em 35 gêneros (RECTOR; VAN RANST, 2013; de VILLIERS, 2013).

Os tipos mais estudados de papilomavírus são o humano (HPV), o bovino (BPV) e o de coelho (CRPV) (CAMPO, 1997). Cerca de 170 tipos de HPVs já foram identificados e classificados em 5 gêneros: alfa-, beta-, gamma-, mu-, e nu-PV. Em contraste, apenas 13 tipos de BPVs são atualmente descritos, sendo os diferentes genótipos classificados em 4 gêneros: *Deltapapillomavirus* (BPV-1, -2, -13), *Dyoxipapillomavirus* (BPV-7), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 e -8) e, *Xipapillomavirus* (BPV-3, -4, -6, -9, -10, -11 e -12) (RECTOR; VAN RANST, 2013). Isso é devido, principalmente, ao fato de que o Papilomavírus humano é extensivamente estudado quando comparados com outros PVs animais (MUNDAY, 2014). Outros critérios, além de análises filogenéticas, podem ser utilizados na classificação dos BPVs. Tais classificações têm como propósito fornecer um melhor enfoque clínico, uma vez que seguem critérios de tropismo tecidual e características histopatológicas das lesões, por exemplo, os *Delta*-BPVs são classificados como PVs cutâneos, os *Xi*-BPVs são epiteliotrópicos e o *Epsilon*-BPVs são cutâneos e epiteliotrópicos (BOCANETI et al., 2016).

O BPV é um grupo de vírus epiteliotrópico espécie-específico que possui como principal hospedeiro o bovino, entretanto, diferentes evidências discutidas por Freitas et al. (2011) apontam que o BPV é o único PV capaz de transpassar a barreira da especificidade pelo hospedeiro e infectar outras espécies como búfalos, girafas, equinos, antas, antílopes, bisões e felinos. Os Delta-PVs são uma exceção, sendo bem reconhecidos como capazes de infectar múltiplas espécies. O BPV do tipo 1 (BPV-1) e tipo 2 (BPV-2) representam um caso conhecido de infecção cruzada entre espécies, infectando equídeos, búfalos e bisontes (SILVESTRE et al, 2009; TOMITA et al, 2007; FREITAS et al., 2011; MUNDAY, 2014).

2.2 Estrutura e Organização do Genoma do BPV

O BPV (Figura 2) possui um genoma contendo 8 ORFs divididas em 3 regiões: a região LCR (*Long Control Region* ou Região Longa de Controle), região de expressão precoce (E) e região de expressão tardia (L) (FREITAS et al., 2011). A região LCR contém a origem de replicação e elementos cis-regulatórios necessários para replicação e transcrição do DNA viral (MUNGER; HOWLEY, 2002). Expressos conforme o ciclo viral nas células hospedeiras, a região de expressão precoce é composta por 6 genes, denominados genes precoces, codificadores de proteínas não-estruturais associadas a replicação e transcrição viral (E1, E2 e E4) e de proteínas envolvidas na transformação celular (E5, E6 e E7). A região de expressão tardia codifica as duas proteínas estruturais formadoras do capsídeo viral (L1 e L2) (STANLEY, 2006; DOORBAR et al., 2012;).

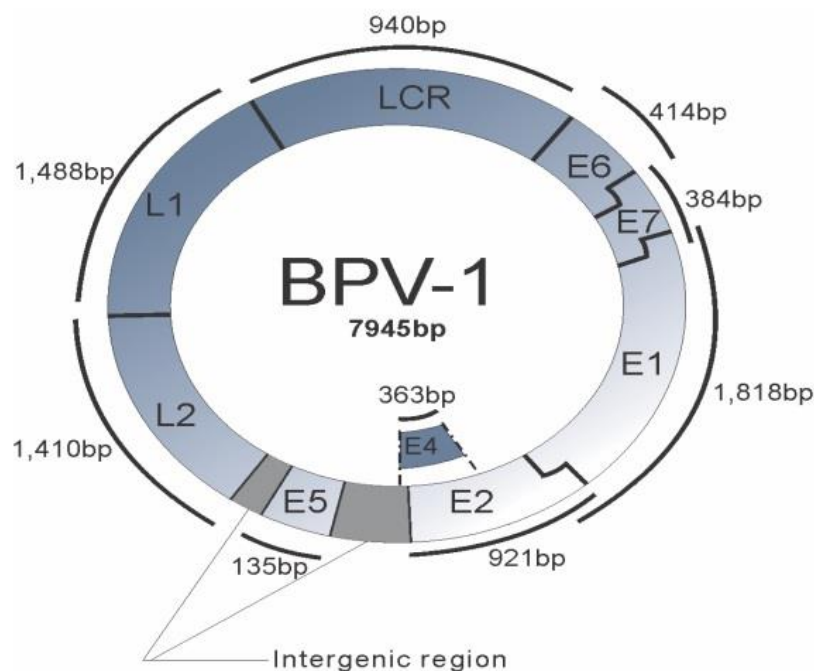


Figura 2. Organização genômica do BPV-1. Relaciona a posição genômica dos genes virais E6, E7, E1, E2, E4, E5, L2, L1, e a longa região de controle (LCR) entre os genes L1 e E6; assim como a região intergênicas entre E2 e E5, e entre E5 e L2 (FREITAS et al., 2011).

A região LCR é uma área não codificante do genoma viral situada entre o terminal 3' da ORF tardia e o terminal 5' da ORF precoce. Possui de 500 a 1000 nucleotídeos dependendo do tipo do papilomavírus e contém a maioria dos sinais regulatórios para replicação e transcrição do DNA viral (NICHOLLS; STANLEY, 2000; MUNGER; HOWLEY, 2002). Os genes precoces codificam as proteínas

envolvidas tanto nos processos de replicação e transcrição do DNA viral, além de poderem alterar a proliferação celular levando a transformação das células (CAMPO, 2006). A proteína E1 atua na replicação do DNA viral desempenhando atividade de helicase, permitindo o desenrolar do genoma viral, e atuando como fator de alongação. O gene E2 está envolvido tanto no controle da transcrição quanto na replicação do DNA viral, sendo responsável pelo reconhecimento e ligação da origem de replicação. A ORF E4 codifica uma família de pequenas proteínas geradas por splicing alternativo e modificações pós-traducionais (DOORBAR, 1991; YANG et al., 1991).

Três proteínas precoces são necessárias para o processo carcinogênico mediada por BPV, sendo chamadas de oncoproteínas: E5, E6 e E7 (NASIR; CAMPO, 2008). Os produtos dessas ORFs são capazes de ultrapassar o controle do ciclo celular e, assim, participar na transformação das células, embora a importância relativa de cada uma destas ORFs na transformação *in vitro* varie entre os diferentes tipos de papilomavírus (CAMPO, 1992). A E5 é uma proteína hidrofóbica associada à membrana capaz de desempenhar um importante papel na perturbação do controle do crescimento celular. A proteína E6 de BPV é conhecida por ter uma grande variedade de parceiros de ligação e de atividades sobre o ciclo reprodutivo do vírus. No BPV-1, o gene E6 codifica uma oncoproteína de 137 aminoácidos capaz de transformar fibroblastos (FREITAS et al., 2011; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008). O E7 de BPV-1 codifica uma proteína de ligação de 127 aminoácidos que coopera com E5 e E6 na indução da transformação celular. A co-expressão com os dois genes mencionados aumenta em muitas vezes a capacidade de transformação celular. Em células infectadas naturalmente, a expressão de E7 BPV-1 é observada tanto no citoplasma quanto nos nucléolos de células pertencentes às camadas basais e camadas espinhosas inferiores, enquanto que E7 BPV-4 é expressa em todas as camadas dos papilomas (BOHL et al., 2001; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008).

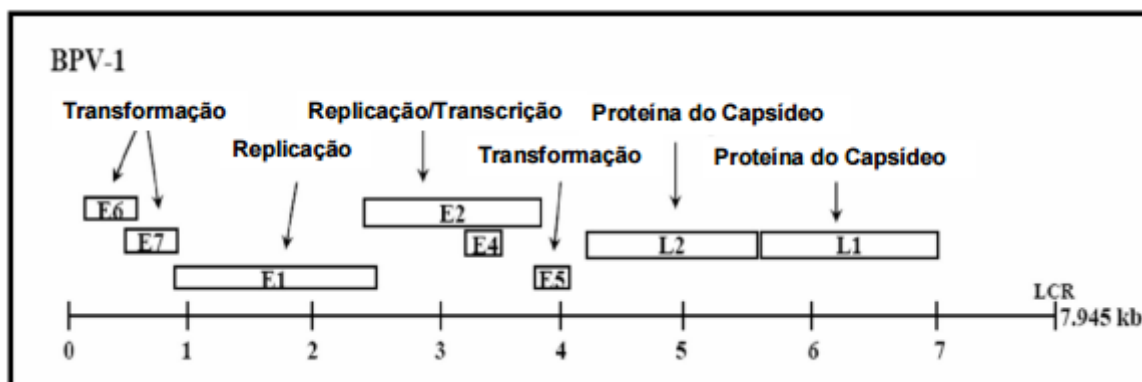


Figura 3. Representação linear do genoma de BPV1 e das atividades bioquímicas das proteínas virais (Adaptado de Campo, 2006).

Os genes tardios L1 e L2, da região de expressão tardia codificam as duas proteínas que compõem o capsídeo viral (Figura 3). O capsídeo é formado por 360 cópias da proteína L1, organizada como 72 capsômeros, e 12 cópias da proteína L2 (MODIS et al., 2002). A proteína L1 é a principal proteína do capsídeo representando cerca de 80% do total de proteínas e possuindo peso molecular de 55 kDa. Diferente de L1, a proteína L2 corresponde uma pequena porção do capsídeo com peso molecular de 77 kDa (BUCK et al., 2005). O gene L1 é utilizado para classificação e construção de árvores filogenéticas, além de participar da ligação do vírus na superfície celular embora pareça que L2 também possa desempenhar um papel na infecção (BERNARD, 2005; DAY; SCHILLER, 2006). Presente em menor quantidade, L2 possui um papel essencial na morfogênese viral, induzindo a montagem do vírion por ligação ao DNA viral favorecendo a sua encapsidação. É detectada exclusivamente como antígeno nuclear nas camadas diferenciadas, sendo mais abundante nos papilomas maduros (ANDERSON et al., 1997; MODIS et al., 2002).

2.2.1 Proteína L1

A principal proteína do capsídeo viral é a L1, apresentando peso molecular aproximado de 55 kDa e possuindo a propriedade intrínseca de automontagem dos seus capsômeros, produzindo capsídeos vazios conhecidos como partículas semelhantes ao vírus (*virus-like particles* ou VLPs) (BISHOP et al., 2007). É a proteína mais conservada entre os PVs, sendo utilizada para classificação e construção de árvores filogenéticas, além de corresponder a cerca de 80 a 90% do capsídeo viral do virion (JOYCE et al., 1999).

Além de sua função estrutural, a L1 atua mediando a ligação do vírus à superfície da célula, estando associado à interação inicial do capsídeo com proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs) da superfície da célula hospedeira (DAY; SCHILLER, 2006). Uma alteração conformacional ocorre devido a esta interação permitindo a exposição da região amino terminal da proteína L2 e resultando em sua clivagem pela enzima furina, desencadeando o processo infeccioso (JOHNSON et al., 2009; RICHARDS et al., 2006). É expressa no núcleo dos queratinócitos diferenciados, junto com L2, sendo mais abundante em papilomas maduros (ANDERSON et al., 1997).

Os monômeros de L1 contém 12 β -fitas, 6 loops e 5 α -hélices (h1-h5). A caracterização bioquímica e estrutural de L1 mostra que as α -hélices na região C-terminal tem um importante papel no dobramento e na montagem do capsídeo. As α -hélices h2, h3 e h4 que estão localizadas próximas a porção C-terminal de L1 são responsáveis pelas interações entre os pentâmeros necessárias para a montagem do capsídeo. As α -hélices h2, h3 e h5 são essenciais para o dobramento de L1 e formação do pentâmero, enquanto a h4 é indispensável para montagem do capsídeo viral, devido seu papel na interação entre os pentâmeros adjacentes (BISHOP et al., 2007).

Os loops da proteína L1 estendem-se em direção à superfície externa do capsídeo e suas sequências são muito variáveis entre os diferentes tipos de papilomavírus. Análises de cristalografia de raio-x de pentâmeros de L1 HPV-16 identificou os loops (Figura 4) na superfície da estrutura do gene (CHEN et al., 2000). A presença de mutações dentro das regiões de loops (BC, CD, DE, EF, FG e HI) possui menor probabilidade de afetar a estrutura tridimensional da proteína quando comparado com mutações nas α -hélices e β -fitas, dessa forma os loops de L1 parecem ser as posições mais promissoras para a inserção de uma sequência exógena dentro da proteína L1 (SADEYEN et al., 2003). Além disso, a maioria dos anticorpos monoclonais capazes de neutralizar a infecciosidade de várias espécies de papilomavírus possui maior probabilidade de se ligarem aos loops, por serem regiões mais expostas da proteína o que as torna mais susceptíveis a ligação.

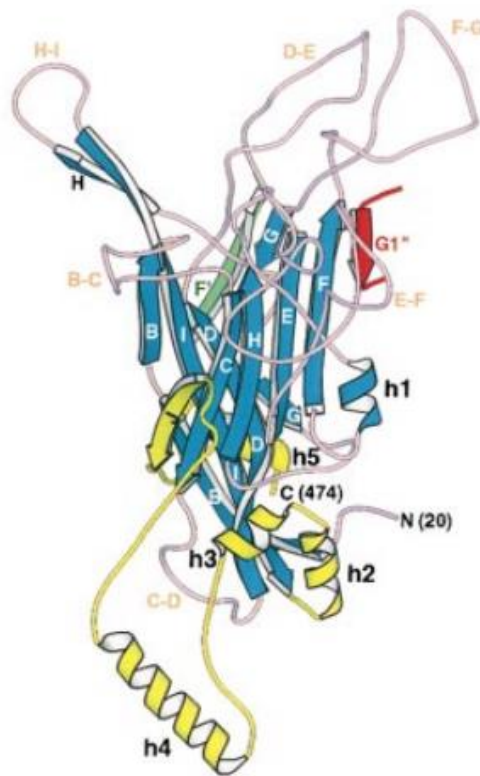


Figura 4. Estrutura do monômero de L1 do HPV-16 incluindo os resíduos de 20-474. O primeiro e último resíduo são, respectivamente, as regiões N-terminal (20) e C-terminal (474). As β -fitas estão em coloração azul, os loops em rosa e as α -hélices em amarelo. Adaptado de CHEN et al., 2000.

Estudos de mutagênese dos domínios de loops variáveis em HPV-6 e HPV-11 revelaram que vários epítomos neutralizantes estão localizados nessa região (LUDMERER et al., 2000; MCCLEMENTS et al., 2001; XU et al., 2006). Embora os arranjos desses loops sejam similares entre quatro tipos de HPV (-11, -16, -18 e -35), uma diferença estrutural mínima no loop de um epítopo é suficiente para romper a ligação anticorpo-epítopo (BISHOP et al., 2007). As regiões dos loops não são bem conservadas entre tipos próximos de papilomavírus, isso se deve provavelmente a pressão seletiva para que os papilomavírus acumulem mutações que impeçam a ligação de anticorpos neutralizantes obtidos por infecções anteriores (BUCK et al., 2013). Apesar da grande homologia na sequência da proteína L1 entre os diferentes tipos de HPV e a conservação geral dos pentâmeros, detalhes estruturais do loop na superfície pentamérica são amplamente diferentes devido às mudanças na composição de aminoácidos, as quais não apenas modificam sua composição como também alteram a antigenicidade da superfície viral. (MARIZ, 2012).

2.2.2 *Oncoproteína E5*

Principal proteína transformante do BPV, o gene E5 codifica uma proteína muito pequena associada à membrana com diferentes atividades biológicas cruciais para o processo de transformação. O E5 de BPV-1 é a menor oncoproteína já caracterizada possuindo apenas 44 aminoácidos. A oncoproteína pode ser dividida em dois domínios distintos: um domínio amino-terminal (resíduos de 1-32) que representa a maior parte da proteína, constituído de resíduos de aminoácidos fortemente hidrofóbicos e um único aminoácido hidrofílico; e um pequeno domínio carboxi-terminal hidrofílico (resíduos 33-34) (CORTEGGIO et al., 2013).

A natureza hidrofóbica do E5 BPV e a ajuda de importante resíduos aminoácidos confere a atividade transformante da oncoproteína, que induz a transformação celular pela ativação e/ou redução de diversos alvos intracelulares envolvidos na proliferação celular e na sobrevivência (HORWITZ et al., 1988; VENUTI et al., 2011). É uma proteína transmembrana de tipo II expressa nas camadas profundas do epitélio infectado estando principalmente localizada nas membranas do retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi das células hospedeiras. Em tecidos naturalmente infectados, o E5 BPV é expresso no citoplasma das células epiteliais basais e suprabasais transformadas com um padrão justanuclear típico devido sua localização no aparelho de Golgi (BORZACCHIELLO et al., 2007).

O E5 desempenha um papel fundamental durante a formação do papiloma. A expressão contínua da proteína E5 dentro da camada basal pode ser responsável pela manutenção de um estado transformado e para um estado ativo durante a fase inicial da infecção. A presença do E5 na camada de células granulares onde as proteínas do capsídeo viral são sintetizadas e os virions são montados sugere a contribuição do E5 na fase tardia do ciclo de vida do BPV (BOHL et al., 2001; BURNETT et al., 1992).

2.3 Papilomatose Bovina

O papilomavírus bovino (BPV) está amplamente distribuído pelo mundo em rebanhos bovinos, sendo reconhecido como o agente etiológico associado à papilomatose bovina. Tal termo é utilizado para designar um conjunto de doenças

que acometem o gado, incluindo desde formas de tumores benignos, que geralmente regridem espontaneamente (MAEDA et al, 2007), até lesões persistentes que sob ação de cofatores, progridem para um carcinoma no trato gastrointestinal superior (BPV-4) ou na bexiga urinária (BPV-1 e -2), levando geralmente à morte do animal. Além dos carcinomas, a infecção pode provocar fibropapilomas cutâneos (BPV-1 e -2), papilomatose das tetas e úbere (BPV-1, -5, -6, -9 e -10), pênis (BPV-1) e papilomas (BPV-8) (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008). Mesmo a progressão benigna da doença requer atenção, uma vez que lesões hiperplásicas (Figura 5) podem depreciar a pelagem dos animais infectados; quando localizados no úbere podem resultar em infecções secundárias e problemas de lactação (FREITAS et al., 2011).

A atuação de cofatores ambientais ou genéticos é necessária para a evolução do processo carcinogênico do BPV, de modo que, são necessários para que lesões induzidas pelo BPV progridam até carcinomas de células escamosas. A *Pteridium aquilinum* ou samambaia de campo, como é conhecida popularmente, tem sido identificada como o principal cofator ambiental associado à carcinogênese induzida pelo BPV (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008). O broto da samambaia de campo é uma das plantas mais amplamente distribuídas no mundo. Intoxicações foram detectadas naturalmente em todo o mundo e demonstradas em experimentos com animais. Diversos componentes foram extraídos dos brotos de samambaia e alguns demonstraram ser tóxicos, como o Ptaquilosídeo (PTA) considerado a principal toxina carcinogênica, induzindo erros na síntese de DNA e levando a mutações de genes envolvidos no controle da divisão celular (SCALA et al., 2014). Além dos seus efeitos tóxicos, a samambaia é a única planta conhecida por naturalmente ser capaz de causar cânceres em animais. A co-infecção com o BPV tipo -2 ou tipo -4 é sugerido como sendo um fator de predisposição para o desenvolvimento de efeitos patológicos (SCALA et al., 2014; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008).

Em rebanhos bovinos, a toxicidade induzida pela ingestão da planta causa três efeitos bem reconhecidos. O pasto de grandes quantidades da planta por períodos de tempo relativamente curtos (semanas a meses) resulta na Síndrome Hemorrágica Aguda originada a partir de uma aplasia da medula óssea, geralmente fatal. Quando ingerida em pequenas quantidades por longos períodos (mais de 1 ano), ocorre o desenvolvimento da Hematúria Enzoótica Bovina que é a forma mais

frequentemente relatada em bovinhos, sendo caracterizada pela presença de sangue e coágulos na urina, podendo resultar na morte por anemia. O desenvolvimento de carcinomas de células escamosas no trato digestivo superior é a terceira manifestação em bovinos (SCALA et al., 2014). Bovinos infectados pela Hematúria Enzoótica Bovina (BEH) frequentemente desenvolvem carcinomas de bexiga urinária e do trato digestivo (BORZACHIELLO; ROPERTO, 2008).

Análises citogenéticas do sangue de animais acometidos pela intoxicação por samambaia relataram uma possível associação entre neoplasias causadas por papilomavírus (PV) e agentes imunossupressores caracterizados do *Pteridium*. Quando ingerida, a samambaia libera agentes tóxicos que possibilitam o desenvolvimento do BPV (SANTOS et al., 1988). Isso ocorre devido à preferência desses agentes pelos linfócitos, resultando em uma acentuada diminuição dos leucócitos polimorfonucleares e uma queda no número de linfócitos circulantes (CAMPO, 2006), além de causarem elevadas alterações cromossômicas pela ação de agentes mutagênicos e intensa proliferação de fatores de crescimento e progressão tumoral. Esse fato permite que os vírus em latência, dentro da célula, se repliquem com maior intensidade e causem maiores danos ao organismo.

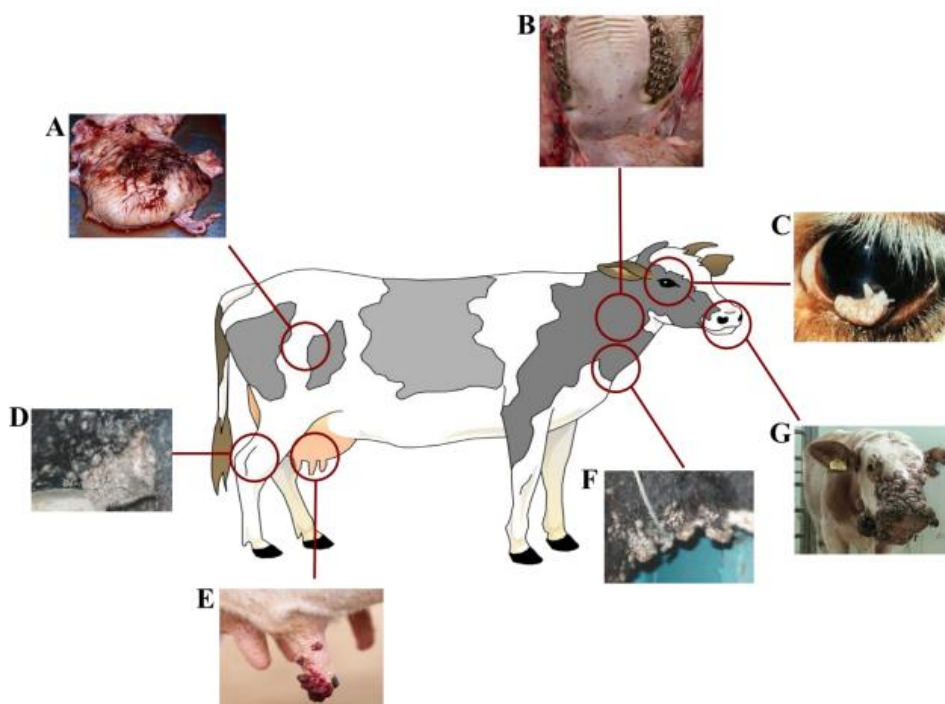


Figura 5. Visão esquemática da papilomatose bovina em diferentes locais na vaca. A) Carcinoma de bexiga urinária B) Papilomas no palato mole C) Papilomas na região ocular D) Verrugas na região do jarrete E) Papilomas nos tetos F) Verrugas na região da barbela G) Verrugas na região da boca e focinho (Fonte: Módolo, 2014).

A infecção pelo BPV representa importantes perdas econômicas para os criadores, uma vez que, resulta na desvalorização dos animais e dificuldades de comercialização, além da deterioração do couro e do próprio animal. Um dano econômico adicional está relacionado ao aparecimento de verrugas genitais, que conduzem à perda da função reprodutiva tanto do macho quanto da fêmea (LIMA et al, 2014). A presença de lesões nas tetas e úbere impede a amamentação dos bezerros e a adequada ordenha dos animais (COMENALE, 2012).

No Brasil, a papilomatose bovina é de relevante importância no impacto econômico do país, porém como não ocorre a notificação obrigatória do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) existe a dificuldade de controle da doença, devido à ausência de dados epidemiológicos precisos sobre o número de casos existentes, a extensão do comprometimento do rebanho, os tipos virais prevalentes, diferenças regionais e consequências clínicas (COMENALE, 2012) potencializando o prejuízo econômico para os criadores.

Atualmente, ainda não existe uma vacina ou tratamento efetivo para o controle da papilomatose. Alguns tratamentos foram estudados por Silva *et al.* (2004) apresentando níveis de sucesso variando entre 15-50%, porém ficou evidente em animais que não se recuperaram após uma primeira intervenção terapêutica que a repetição do tratamento é economicamente inviável já que o custo por cada animal recuperado apresentou-se bastante elevado. Diferentes protocolos foram testados a fim de avaliar o efeito da repetição dos tratamentos, na recuperação clínica de bovinos portadores de papilomas planos e pedunculados, utilizando autovacina, autohemoterapia, diaceturato do diaminodiazaminobenzeno; clorobutanol; autovacina e autohemoterapia; autovacina e diaceturato; autovacina e clorobutanol; autohemoterapia e diaceturato; autohemoterapia e clorobutanol; autovacina, autohemoterapia, clorobutanol e diaceturato.

2.4 Estratégia vacinal

Até o presente momento, não foram desenvolvidas vacinas profiláticas ou terapêuticas comerciais eficazes para a prevenção e tratamento da papilomatose bovina, apesar de, o BPV ter sido explorado como modelo experimental tanto para compreensão do potencial oncogênico viral quanto para desenvolvimento das atuais vacinas anti-HPV (MAEDA et al, 2007; BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008). A

produção de uma vacina eficaz, segura e de baixo custo poderá resultar em uma grande redução na incidência e mortalidade de animais infectados pelo BPV (LIMA et al, 2014). As oncoproteínas do BPV são responsáveis pela progressão das lesões (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008), sendo considerados alvos adequados para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas, pois estimulam a resposta celular contra as células malignas.

A proteína L1 do PV é a principal proteína do capsídeo viral, tendo importância na infecção e imunogenicidade (BORZACCHIELLO; ROPERTO, 2008). Quando produzida em sistemas recombinantes, é capaz de auto conformar-se em VLPs e induzir respostas protetoras em animais imunizados, por isso compõem a base das atuais vacinas anti-HPV (COMENALE, 2012), sendo capazes de induzir um alto título de anticorpos neutralizantes tipo-específicos, mas não podendo conferir proteção contra infecções com tipos heterólogos de PV (HERNANDEZ et al., 2012; SLUPETZKY et al., 2007; JAGU et al., 2010).

As partículas semelhantes ao vírus (*virus-like particles*, VLPs) podem ser obtidas a partir da superexpressão da proteína L1 e da coexpressão de ambas as proteínas L1 e L2 em células de inseto e leveduras, como foi demonstrado pioneiramente por Kirnbauer et al. (1992 e 1993). Essas partículas são espontaneamente montadas pela associação de 72 capsômeros de L1 e 72 cópias de L2, quando esta proteína é coexpressa, em células eucarióticas e não apresentam genoma viral, se assemelhando estrutural e antigenicamente aos vírions (SCHILLER; LOWY, 2000; SCHILLER; MÜLLER, 2015).

Estudo realizado utilizando as VLPs L1–E7 do HPV comprovou a capacidade dessas proteínas fusionadas de induzirem anticorpos neutralizantes e acionar a resposta imune mediada por células, promovendo, assim, uma eficácia antitumoral em modelo murino para o câncer cervical (SHARMA et al, 2012). No entanto, o principal obstáculo dessa estratégia está na fraca resposta terapêutica induzida contra a proteína E7 provavelmente devido à imunodominância de L1 sobre E7 (ASHRAFI et al., 2008). De maneira semelhante, as VLPs utilizando a proteína L1 e a principal oncoproteína do BPV E5 fusionadas na região dos loops, poderiam ser capazes de apresentar um maior potencial profilático e terapêutico advindos das

características já conhecidas dessas proteínas, sendo assim, importante a realização de estudos mais aprofundados.

2.5 Sistemas de expressão heterólogos

Diversos sistemas de expressão têm sido estudados para a produção de proteínas heterólogas dos papilomavírus, como células de mamíferos, plantas, bactérias, células de insetos e leveduras. Esses sistemas se mostraram confiáveis e eficientes na produção de antígenos em larga escala, com um elevado grau de homogeneidade na produção (COUTINHO et al., 2013). Contudo, o sistema de expressão de genes heterólogos ideal deve levar em consideração as características e as possíveis aplicações das proteínas expressas a partir do gene de interesse. Esses critérios são determinados por questões econômicas, se tratando de produção de enzimas de interesse industrial, e por questões de biossegurança, se considerar a produção de fármacos (STRASSER; GELLISSEN, 1998).

Dentre as várias opções disponíveis, sistemas heterólogos que empregam leveduras e bactérias são reconhecidamente os mais explorados e bem caracterizados. Embora as duas alternativas ofereçam a melhor relação custo-benefício por atingirem altas densidades celulares em meios de cultura baratos, a grande vantagem das leveduras sobre as bactérias é a sua capacidade de realizar muitas das modificações pós-traducionais associadas a eucariotos superiores e necessárias para a atividade biológica de muitas proteínas. (MACAULEY-PATRICK et al., 2005). Contudo, aproximadamente, um terço das proteínas recombinantes para aplicação terapêutica que foram aprovadas pelas agências de vigilância americana (FDA – *Food and Drug Administration*) e europeia é produzida em *Escherichia coli*, colocando esse microrganismo como principal hospedeiro para produção de recombinantes (HUANG et al., 2012).

E. coli possui como vantagens o crescimento rápido, baixo custo de cultivo, facilidade de rápida e precisa modificação do genoma, características genéticas bem conhecidas e a disponibilidade de ferramentas para expressão gênica. A produção de recombinantes em *E. coli* é menos dispendiosa e mais fácil de ser manipulada que em outros sistemas de expressão (GOOPAL; KUMAR, 2013). Apesar da ausência de uma maquinaria para modificações pós-traducionais, a habilidade da *E.*

coli acumular proteínas recombinantes em até 80% do seu peso seco contribui para a preferência desse sistema de expressão em uma ampla gama de aplicações (PACHECO, et al, 2011).

Os sistemas de expressão de eucariotos, em contraste ao procarioto, possuem a capacidade de realizar as modificações pós-traducionais necessárias para obtenção da atividade biológica das proteínas recombinantes (COUTINHO et al, 2013). Alguns sistemas eucariotos já vêm sendo utilizados para a expressão de L1 e produção de VLPs ou capsômeros como, sistemas baseados em células de insetos, mamíferos, leveduras e plantas. As atuais vacinas preventivas existentes contra HPV baseadas em VLPs são produzidas em células de leveduras (Gardasil) e células de insetos (Cervarix) (SCHILLER et al., 2012).

2.6 Sistemas baseados em *Leishmania tarentolae*

Membros da família *Trypanosomatidae*, os tripanossomatídeos são protozoários unicelulares e uniflagelados representantes do grupo dos Kinetoplastídeos (Ordem *Kinetoplastida*). Trata-se de organismos eucariontes caracterizados pela presença de kinetoplasto, uma região rica em DNA extranuclear contida numa única e grande mitocôndria. Os membros desse grupo incluem parasitas que possuem a capacidade de colonizar plantas, humanos e animais, sendo de particular interesse a relação desses parasitas com doenças humanas: o *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania* spp. são, respectivamente, os agentes causais da doença de Chagas, doença do sono e leishmanioses cutâneas e viscerais (STUART et al., 2008; WHO, 2010).

Recentemente, um novo sistema de expressão eucarioto empregando o protozoário parasita unicelular *Leishmania tarentolae* tem sido sugerido como um vetor vacinal vivo, uma vez que não representam um risco de infecção e produz uma potente resposta imune (SALEHI et al., 2012; BOLHASSANI; ZAHEDIFARD, 2012; NIIMI, 2012). São micro-organismos não patogênicos aos humanos e possuem a capacidade de infectar lagartos do gênero *Gekkonidae*, tendo sido primeiramente isolado do réptil *Tarentola mauritanica* (MIZBANI et al., 2010; RAYMOND et al., 2012). A *L. tarentolae* foi explorada em culturas axênicas por muitos anos como modelo não patogênico para estudos de biologia molecular de Tripanossomatídeos

(KUSHNIR et al., 2005; MUREEV et al., 2007). O principal atrativo do uso da *L. tarentolae* como sistema de expressão se deve principalmente pela capacidade de realizar padrões de modificações pós traducionais similares às descritas em mamíferos (BREITLING et al., 2002). Quando comparado aos sistemas de expressão baseados em células de mamíferos e de insetos, a *L. tarentolae* tem como vantagem uma fácil manipulação genética, adaptação simples a produção em larga escala, além de ser capaz de atingir taxas de crescimento mais elevadas em meios simples contendo apenas hemina como ingrediente de origem animal, sendo adaptável inclusive a tecnologias de fermentação (FRITSCHKE et al., 2008; BASILE; PETICCA, 2009; NIIMI, 2012).

Diferente de outras linhagens patogênicas de *Leishmania*, a espécie *L. tarentolae* é incapaz de se replicar nas APCs por não possuir genes relacionados a patogenicidade resultando em sua eliminação no hospedeiro murino após a infecção (BRETON et al., 2005; BRETON et al., 2007). Apesar da incapacidade de infectar mamíferos, quando inoculados mimetizam uma infecção no organismo, induzindo a proliferação de linfócitos T, produção de IFN- γ , ativação do processo de maturação das células dendríticas, estimulação de sinais inflamatórios, ativação de respostas baseadas em células Th1 e, finalmente, atuam como um adjuvante, sem causar toxicidade tecidual (BRETON et al., 2005; BRETON et al., 2007; MIZBANI et al., 2010; BOLHASSANI; ZAHEDIFARD, 2012; HOSSEINZADEH et al., 2013). Seu potencial como vetor vacinal vivo foi comprovado em animais desafiados contra a leishmaniose visceral e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BOLHASSANI; ZAHEDIFARD, 2012; BRETON et al., 2005; MIZBANI et al., 2010). Estudos realizados por Salehi et al. (2012) demonstraram que uma linhagem recombinante de *L. tarentolae* expressando níveis elevados de HPV16 E7 possuía atividade imunogênica, além de ter a capacidade de induzir a produção de IFN- γ . Os efeitos da proteção observada pela vacina viva por via subcutânea foi semelhante aos obtidos pela vacina de DNA no mesmo estudo utilizando modelos murinos. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos *in vivo* de Bolhassani et al. (2011) com camundongos utilizando o vetor parasitário expressando altos níveis de E7 HPV-16 fusionado com uma proteína fluorescente (GFP).

Por isso, a aplicação do vetor vivo não patogênico *Leishmania tarentolae* é de grande expectativa para o desenvolvimento dessas vacinas, uma vez que não

representam um risco de infecção e produz uma potente resposta imune em seres humanos. A vacinação recombinante viva é considerada uma estratégia crucial para o desenvolvimento de vacinas contra os PVs, devido a maior imunogenicidade que possui quando comparada com as vacinas de subunidades (SALEHI et al., 2012). Dentre as principais vantagens relacionadas ao uso de vetores vacinais vivos, é possível citar: (i) tratam-se de microrganismos naturalmente capazes de acessar células e capturar a maquinaria hospedeira para expressar proteínas próprias; (ii) são indutores de potentes respostas imunes, tanto humoral quanto celular e; (iii) atuam como adjuvantes imunoestimulatórios.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Produzir construções para expressão de diferentes antígenos de BPV1 em linhagens recombinantes de *Leishmania tarentolae* baseadas em um vetor de expressão não comercial.

3.2 Objetivos Específicos

- Obter genes de L1 e quimeras de L1-E5 contendo os diferentes epítomos de E5 de BPV-1
- Clonar o gene L1 e as quimeras L1-E5 em vetor de expressão de *Leishmania tarentolae*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Construção das quimeras de L1-E5 por PCR de fusão.

Foram utilizados nesse estudo o gene L1 selvagem de BPV1 e três construções quiméricas que se baseiam na inserção de diferentes epítomos da oncoproteína viral E5 na região do loop D-E da proteína L1 com potencial para geração de antígenos profilático-terapêuticos. A escolha dos epítomos foi feita previamente pelo grupo a partir de predições realizadas com o programa *IEDB Analysis Resource* (TENZER *et al.*, 2005) mediante a análise da sequência da proteína E5 e identificação de regiões na sequência prováveis de gerar uma resposta terapêutica.

A amplificação dos referidos genes foi realizada a partir do gene L1 selvagem (BPV1) previamente clonado em vetor para expressão de *Pichia pastoris* pPGKΔ3 sem otimização de códons (de JESUS, 2013). A construção das quimeras aconteceu mediante PCR de fusão, utilizando *primers* específicos (Tabela 1) desenvolvidos para a fusão dos epítomos de E5 no gene L1 com base nas sequências presentes no *GenBank* do NCBI (número de acesso GI: 958575613), utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.2.5).

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizadas na PCR de fusão

Prímer	Sequência de oligonucleotídeos	Fragmento
Forward L1-BPV	5' – CG G GAT CCC CAT GGG CCA TGG CGT TGT GGC AAC AAG GCC AGA – 3'	428 pb
Reverso L1-BPV	5' – GGG GTA CCT TAT TTT TTT TTT TTT TTT GCA GGC – 3'	1115 pb
Del_D-Eloop_E5.1 (R)	5' – TCC CAA GAA CAA TAG AAA CCA TAG ATT CAC ATT TTC TGC ATC AAG CAA A – 3'	428 pb
Primer del_D-Eloop_E5.1 (F)	5' – CTA TGG TTT CTA TTG TTC TTG GGA ACA ACA GAT GAC AGG AAA CAA ACA G – 3'	1115 pb
Del_D-Eloop_E5.2 (R)	5' – GGA GCA CTC AAA ATG ATC GTA ATT CAC ATT TTC TGC ATC AAG CAA A – 3'	428 pb
Del_del_D-Eloop_E5.2 (F)	5' – TAC TGG GAT CAT TTT GAG TGC TCC ACA ACA GAT GAC AGG AAA CAA ACA G – 3'	1115 pb
Del_D-Eloop_E5.3 (R)	5' – ATC CCA GTA TAC AAG AAA AAA CAA ATT CAC ATT TTC TGC ATC AAG CAA A – 3'	428 pb

Del_del_D- Eloop_E5.3 (F)	5' – TTG TTT TTT CTT GTA TAC TGG GAT ACA ACA GAT GAC AGG AAA CAA ACA G – 3'	1115 pb
------------------------------	--	---------

As seqüências destacadas GGATCC, CCATGG, GCCATG, GGTACC e TTA se referem respectivamente aos sítios de *Bam*HI, *Nco*I, seqüência Kozak, *Kpn*I e códon de parada. As seqüências grifadas em amarelo, rosa e cinza correspondem aos diferentes epítomos de E5.

As reações de PCR foram realizadas em duas etapas, sendo na primeira amplificados dois fragmentos separados onde em um dos fragmentos foi fusionado o epítipo de E5; na segunda etapa, os fragmentos obtidos são fusionados entre si resultando nas quimeras (Figura 6). Para a reação foi utilizado o *Phusion*[®] *High-Fidelity DNA Polymerase* (New England BioLabs), dNTPs (10µM) e MgCl₂ (0,5µM), em um volume de reação final de 25 µL. Os *primers* foram utilizados na concentração de 25 µM. As condições de ciclagem da PCR *touchdown* foram inicialmente de 10 ciclos com desnaturação inicial à 98°C por 3 minutos, anelamento à 68°C-58°C por 15 segundos com decréscimo da temperatura durante os 10 primeiros ciclos e extensão à 72°C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de desnaturação à 98°C por 30 segundos, anelamento à 58°C por 45 segundos e extensão à 72°C por 1 minuto e, por último, uma extensão final de 72°C por 3 minutos.



Figura 6. Desenho esquemático das etapas da PCR de fusão. (1) Primeira etapa da PCR utilizando os primers L1 forward com o reverse do epítipo de E5 e o forward do epítipo de E5 com L1 reverse para a amplificação dos fragmentos de 428 e 1115 pb, respectivamente. (2) Segunda etapa da PCR utilizando os primers L1 forward e L1 reverse para a fusão dos dois fragmentos previamente sintetizados. (3) Gene quimérico construído, evidenciando em azul o epítipo de E5 e, em vermelho e roxo os sítios de restrição inseridos.

Finalizada a PCR, as construções (Figura 7) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose e visualizadas no transluminador de luz ultravioleta. Na

eletroforese de DNA foram utilizados géis de agarose a 1%, com tampão TBE 1X, adicionado de *SYBR[®] Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen). Os produtos da PCR foram aplicados misturados ao tampão de amostra e tendo como referencial o marcador 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). As bandas de 1500pb referentes às construções foram excisadas do gel e purificadas com o kit *GE GEX, DNA and gel bond purification* (GE Healthcare), com posterior quantificação das amostras no *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific).

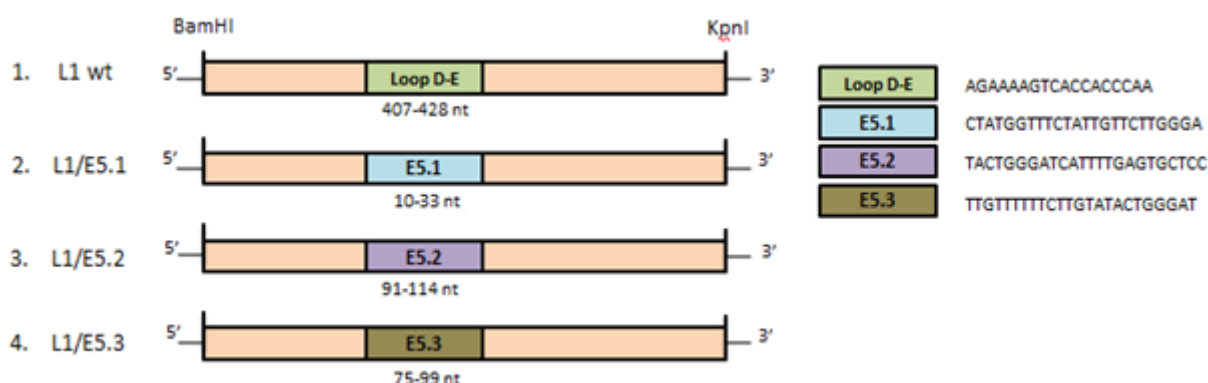


Figura 7. Desenho esquemático dos genes de estudo. Todos os genes apresentam sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI na região 5' e para *Kpn*I na região 3'. 1. Gene L1 selvagem, sem modificações (1488pb). 2. Inserção do epítipo 1 do gene E5 na região do loop D-E (1520pb). 3. Inserção de epítipos do gene E5 na região do loop D-E (1520pb). 4. Inserção de epítipos do gene E5 na região de loop D-E (1520pb).

4.2 Clonagem no vetor pGEM-T Easy

Antes de serem clonadas no pGEM-T Easy, as construções foram submetidas a uma reação de adenilação para adição de terminais de adenina nos insertos e incubadas a 70°C por 25 minutos no termociclador. A concentração dos insertos utilizados na reação foi de 240 ng/μL, 180 ng/μL, 147 ng/μL e 220 ng/μL para L1/E5.1, L1/E5.2, L1/E5.3 e L1wt, respectivamente. Para a reação foram utilizados o tampão *GoTaq Flexi*, a enzima *GoTaq DNA Polymerase* (Promega), dATP (5 mM) e MgCl₂.

Os genes foram subclonados no vetor de passagem pGEM-T Easy (Promega) por meio de uma reação de ligação com a enzima T4 DNA *ligase*, seguindo orientações do fabricante, em uma proporção 3:1 (inserto:vetor). A reação foi incubada a 4°C *overnight* a fim de garantir o máximo número de transformantes. O vetor pGEM-T Easy (Figura 8) foi desenvolvido para facilitar a clonagem de produtos

de PCR, apresentando uma terminação de timidina na região 3' que melhora significativamente a eficiência da ligação do produto de PCR no plasmídeo. O vetor possui um sistema de controle transcricional baseado no gene T7 e SP6 RNA polimerase e apresenta o gene de resistência a ampicilina como marca de seleção.

Os plasmídeos oriundos da reação serviram como agente transformante para a *Escherichia coli* (DH10 β). A linhagem utilizada apresenta propriedades particularmente úteis na pesquisa científica, como: alta eficiência de transformação e a capacidade de integração e manutenção de grande plasmídeos. A transformação química por choque térmico foi realizada seguindo o protocolo de SAMBROOK *et al.* (1989) que consiste das seguintes etapas: os produtos da ligação (5 μ L) foram adicionados a 50 μ L de células quimiocompetentes (previamente tratadas com CaCl₂), homogeneizadas e mantidas no gelo por 20 minutos; posteriormente as células foram submetidas a um choque térmico (42°C) por 5 minutos e, colocadas novamente no gelo por 1 minuto.

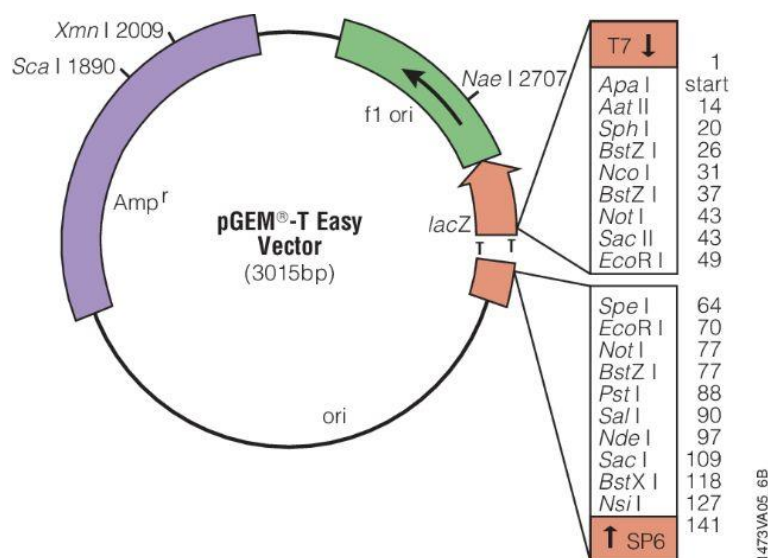


Figura 8. Mapa do vetor pGEM-T Easy (Promega)

A fim de garantir a recuperação das células bacterianas, foi adicionado 800 μ L do meio de cultura Luria-Bertani (LB) sem antibiótico, com posterior incubação a 37°C por 1 hora. As células foram centrifugadas a 1200 rpm e alíquotas de 200 μ L foram semeadas em placas de LB com ampicilina, IPTG e X-gal. Para a etapa de transformação o meio de cultura Luria-Bertani (LB) apresentou a seguinte composição: triptona 1%, extrato de levedura 0.5% e NaCl 1%, adicionando 100

µg/mL de Ampicilina. Para meio sólido, foi acrescentado 2% de ágar. A temperatura de incubação das placas para cultivo foi de 37°C, *overnight*. As colônias resistentes a ampicilina foram repicadas para inóculo e extração do DNA plasmidial, conforme protocolo descrito por SAMBROOK et al. (1989).

A confirmação da clonagem ocorreu por análise dos fragmentos obtidos após o tratamento do DNA com as enzimas de restrição *BamHI* (Promega) e *KpnI* (Promega). A digestão realizada com essas enzimas foi possível devido a inserção desses sítios de restrição nos *primers* construídos (Tabela 1). A reação foi incubada a 37°C *overnight*. O resultado da digestão foi observado por eletroforese em gel de agarose. Na eletroforese de DNA foram utilizados géis de agarose a 1%, com o tampão TAE 1X, adicionado de brometo de etídeo (0,5 µg/ml). O material aplicado foi misturado com tampão de amostra (*Loading Dye 6X*) e tendo como referencial o marcador GeneRuler 1 Kb DNA later (Fermentas).

As construções também foram analisadas por sequenciamento de DNA na Plataforma Tecnológica de Sequenciamento do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica (LABCEN – UFPE) com os *primers* M13F e M13R. Para o sequenciamento foi feita extração das amostras com o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega). As análises de sequências e alinhamentos de DNA foram conduzidas pelo *ClustalW Multiple Alignment Tool*, disponível no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.0.5.3) (HALL, 1999, <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Confirmada a correta construção das quimeras, as mesmas foram selecionadas para clonagem nos vetores de expressão pSPααNeo previamente desenvolvido (MARIZ, 2016).

4.3 Clonagem nos vetores de expressão pSPααNeo

As construções foram digeridas do vetor pGEM-T Easy com as enzimas *BamHI* e *KpnI* e purificadas com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) para posterior ligação no vetor de expressão. O vetor pSPααNeo (Figura 9) é resultado da fusão do vetor comercial pSP72 (Promega) com o cassete αNeo, onde NEO é o gene da Neomicina fosfotransferase de resistência ao antibiótico Geneticina (G418). O cassete αNeo, ainda contém duas regiões intergênicas da α-tubulina (α-tubulin intergenic region) de *L. enriettii* (MCNICOLL et al., 2005) flanqueando o gene de interesse e otimizando o processamento do RNA mensageiro

do gene exógeno, possibilitando assim uma maior produção de proteínas recombinantes quando comparado com outros vetores.

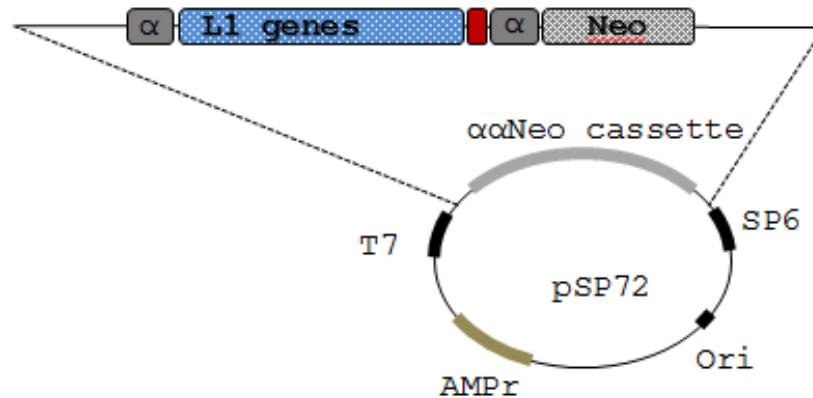


Figura 9. Ilustração esquemática do mapa do vetor de expressão pSPαNeo resultante da fusão do vetor pSP72 ao cassete αNeo

O vetor pSP72 (Figura 10) pode ser utilizado como um vetor de clonagem padrão e para a transcrição de RNA *in vitro*. Possui um sistema de controle transcricional baseado no gene T7 e SP6 RNA polimerase flaqueando a região de clonagem; e como marca de seleção o gene de resistência a ampicilina.

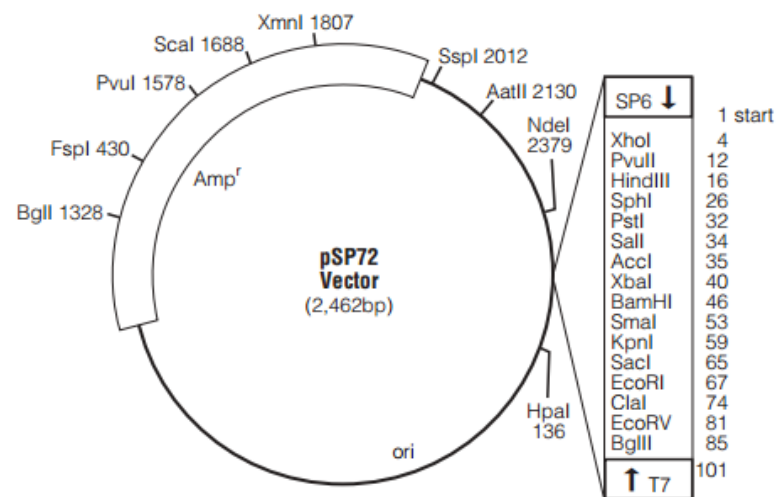


Figura 10. Mapa do vetor pSP72 (Promega)

O vetor pSPαNeo foi digerido com as enzimas *BamHI* e *KpnI*, e posteriormente uma reação de desfosforilação do vetor foi realizada a fim de impedir a recircularização do mesmo durante a reação de ligação. A reação de desfosforilação foi realizada utilizando a enzima *Antarctic Phosphatase* (New England BioLabs) e incubada a 37°C por 30 min. Os vetores foram purificados

utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e uma eletroforese em gel de agarose foi feita para observação dos vetores purificados. A reação de ligação foi realizada utilizando a T4 DNA ligase, seguindo as orientações do fabricante em uma proporção de 3:1 (inserto:vetor) e incubadas a temperatura ambiente por 18h.

O produto da ligação foi utilizado como agente transformante para *E.coli* (Top10), sendo realizado transformação química por choque térmico seguindo as orientações de SAMBROOK *et al.* (1989). Após a recuperação das células, as mesmas foram semeadas em placas com meio de cultura LB contendo ampicilina e incubadas a 37°C *overnight*. Com as colônias resistentes a ampicilina, foram feitos inóculos para extração do DNA plasmidial, conforme protocolo descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). A confirmação da subclonagem no vetor de expressão ocorreu por digestão dos fragmentos com as enzimas de restrição *BamHI* (New England Biolabs) e *KpnI* (New England Biolabs). A reação foi incubada a 37°C *overnight* e analisada por eletroforese em gel de agarose.

5 RESULTADOS

5.1 Construção dos genes candidatos baseados em L1

A Figura 11 mostra o resultado representativo de uma das PCRs de fusão realizadas com a amostra de L1 de BPV-1 amplificada a partir do clone no vetor pPGKΔ3L1. A imagem corresponde à primeira etapa da PCR de fusão, onde é observada a amplificação de dois fragmentos de tamanhos diferentes: um de 1115 pb, referente a porção codificante de L1 situada imediatamente após o loop DE até o códon de parada; e outro de 428 pb, referente a porção codificante inicial de L1 na qual o loop DE foi substituído pelos epitopos da proteína E5 (dependendo da quimera) já descritos.

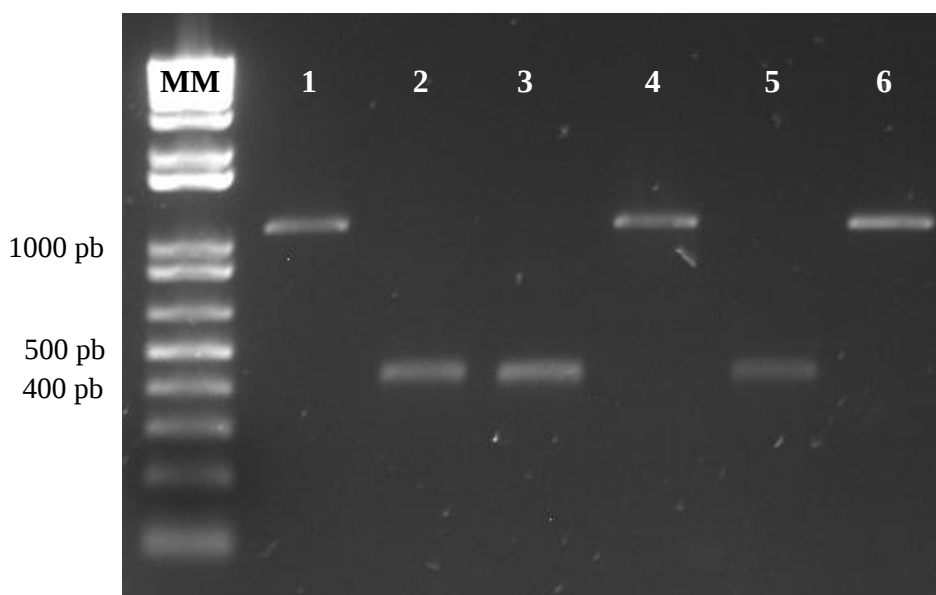


Figura 11. Gel representativo da primeira etapa da PCR de fusão. Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X. MM – 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). (1) Fragmento de 1091 pb obtido após a amplificação com os primers L1 reverse e Del_del_D-Eloop_E5.3. (2) Fragmento de 429 pb obtidos com os primers L1 forward e Del_D-Eloop_E5.3. (3) Fragmento de 429 pb obtidos com os primers L1 forward e Del_D-Eloop_E5.2. (4) Fragmento de 1091 pb obtido com os primers L1 reverse e Del_del_D-Eloop_E5.2. (5) Fragmento de 429 pb obtidos com os primers L1 forward e Del_D-Eloop_E5.1 (6) Fragmento de 1091 pb obtidos com os primers L1 reverse e Primer del_D-Eloop E5.1

A segunda etapa da PCR de fusão foi realizada pela fusão dos fragmentos de 1115 pb e 428 pb obtidos na primeira etapa. Para essa etapa foram utilizados apenas os *primers* Forward e Reverse de L1. Na Figura 12, é possível observar a presença de bandas de 1500 pb referente a amplificação das construções quiméricas de L1/E5.1, L1/E5.2 e L1/E5.3, além de L1 selvagem. As construções apresentam um tamanho de 1520 pb e o L1 selvagem possui 1488 pb. As amostras

purificadas apresentaram concentrações de 48 ng/μL; 37,4 ng/μL; 29,4 ng/μL e 44,1 ng/μL para L1/E5.1, L1/E5.2, L1/E5.3 e L1wt, respectivamente. Essas concentrações foram conseguidas após repetidas reações de PCR.

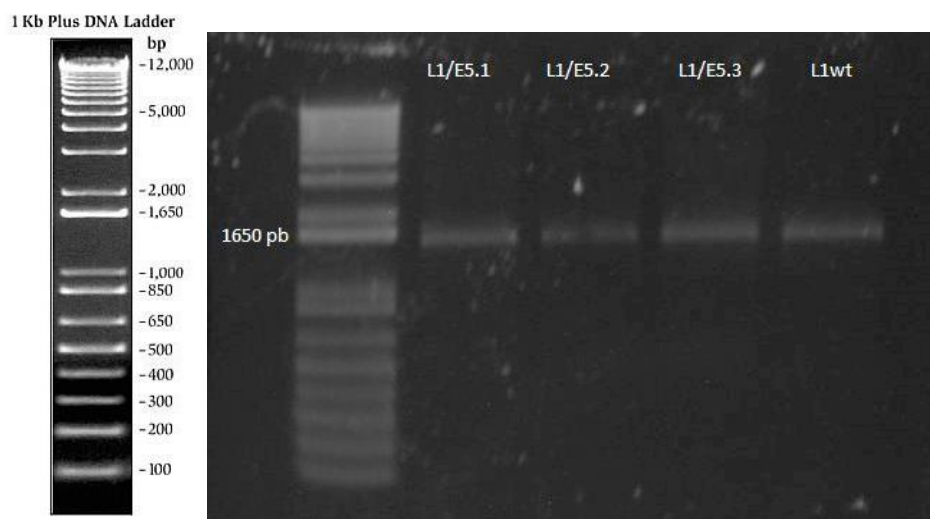


Figura 12. Gel representativo das construções obtidas após a segunda etapa da PCR de fusão. Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X. MM – 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

5.2 Clonagem no pGEM-T Easy

Com a adição dos terminais de adenina aos insertos, a ligação das construções ao vetor pGEM-T Easy foi possível com a enzima T4 DNA ligase. As células de *E.coli* DH10β quimiocompetentes foram transformadas com alíquotas da reação de ligação. As células transformadas adquiriram resistência a ampicilina quando submetidas à seleção em placa. As linhagens recombinantes foram submetidas à extração plasmidial e análises de restrição enzimática (Figura 13) com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*II confirmou a clonagem no vetor de passagem pGEM-T Easy.

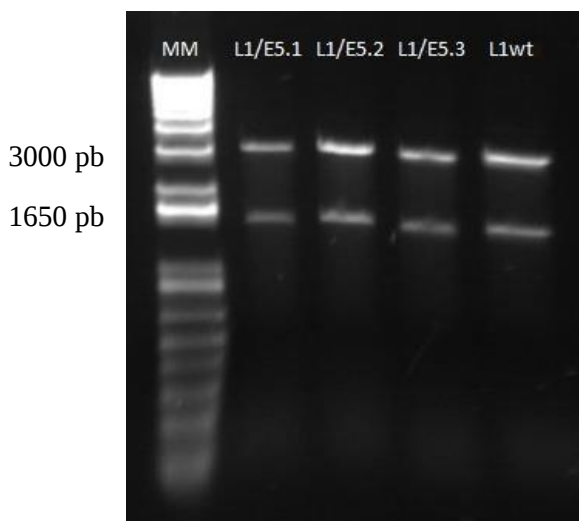


Figura 13. Gel representativo da digestão das quimeras no vetor pGEM-T Easy com *Bam*HI e *Kpn*I. Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x. MM – 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

5.3 Análise do Sequenciamento da Clonagem em pGEM-T Easy

Nas análises do sequenciamento foi observado que as quimeras obtidas da fusão do gene L1 com os epítomos E5.1, E5.2 e E5.3 foram corretamente construídas como esperado, havendo a manutenção do quadro de leitura do gene após a comparação com a sequência protótipo. Os epítomos foram corretamente inseridos na região do loop DE do gene L1, além disso, os sítios de restrição de *Bam*HI (GGATCC) e *Kpn*I (GGTACC), o códon de parada (TAA) e a sequência Kozak (GCCATG) foram também inseridos podendo ser observados nas análises do sequenciamento. O gene L1 selvagem foi corretamente amplificado por PCR apresentando o códon de parada em sua estrutura.

Foram observadas 27 mutações (Tabela 2) em cada sequência quimérica construída de L1, L1/E5.1, L1/E5.2 e L1/E5.3, entretanto nenhuma ocorreu na região do loop DE e a maioria ocorreu na terceira base do códon não interferindo na síntese da proteína de maneira significativa. As sequências obtidas no sequenciamento encontram-se na seção Anexo. As mutações observadas representam um percentual de 1,77%.

Tabela 2. Identificação das mutações presentes nas sequências quiméricas. Posição do nucleotídeo na sequência, qual o nucleotídeo original e a qual o nucleotídeo inserido após a mutação.

	Posição do nucleotídeo na sequência	Nucleotídeo original	Mutação
1	80	T	C
2	109	G	A
3	181	C	A
4	233	A	G
5	323	G	A
6	456	C	T
7	480	C	T
8	550	T	C
9	554	A	T
10	557	T	A
11	770	A	G
12	826	C	G
13	827	C	T
14	833	T	A
15	845	G	A
16	865	C	G
17	893	T	A
18	944	C	T
19	972	A	T
20	1063	G	A
21	1064	A	G
22	1075	C	A
23	1089	T	A
24	1215	G	C
25	1274	C	G
26	1349	G	A
27	1445	A	C

5.4 Subclonagem no vetor de expressão pSP α NEO

A subclonagem no vetor de expressão das quimeras obtidas foi possível após a modificações no processo de digestão do vetor pSP α NEO e na utilização de uma concentração satisfatória dos insertos. A fim de garantir a completa digestão do vetor, foram realizadas quatro digestões a uma concentração de 394 ng/uL cada.

Na eletroforese em gel de agarose pode ser observada uma banda bem definida na altura de aproximadamente 5 Kb referente ao vetor de expressão indicando que a amostra foi bem digerida não sendo observados rastros que indicassem a presença de vetor fechado (Figura 14).

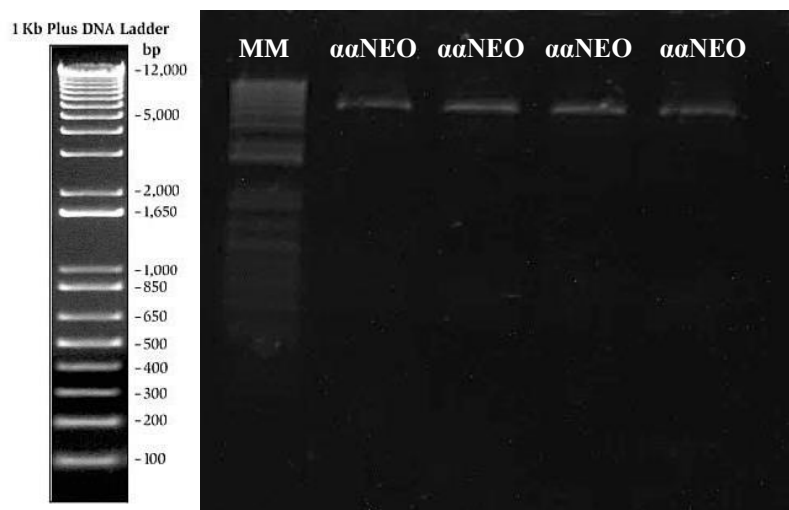


Figura 14. Gel representativo de digestões enzimáticas do vetor de expressão pSP $\alpha\alpha$ NEO com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*II. Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x. MM – 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

Após a purificação do vetor, a transformação de *E.coli* Top 10 foi realizada e a subclonagem no vetor de expressão das construções quiméricas foi confirmada por análises de restrição enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*II. Na eletroforese em gel de agarose foi observado a liberação de o fragmento de 1520 pb referente as construções quiméricas e um fragmento de 4718 pb correspondente ao vetor pSP $\alpha\alpha$ NEO (Figura 15).

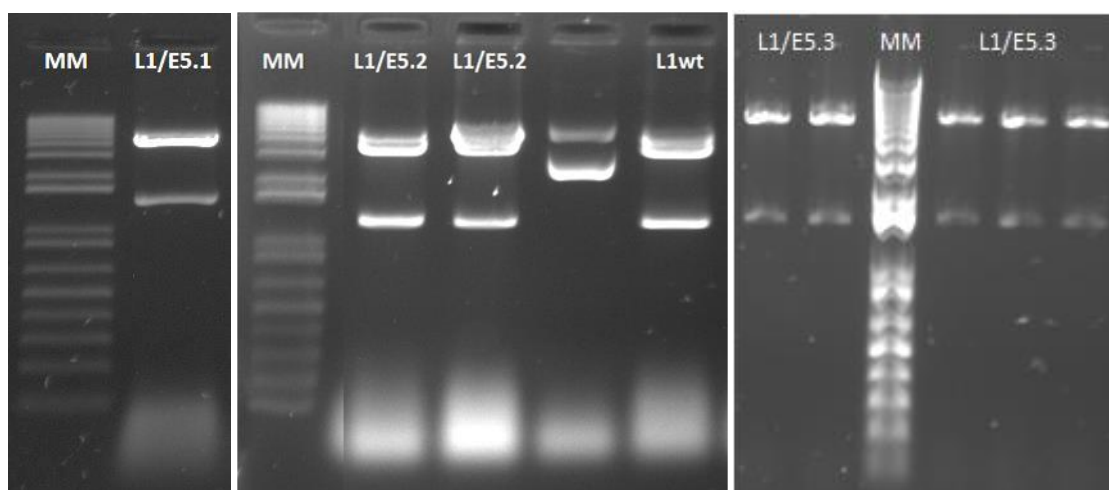


Figura 15. Gel representativo da digestão das quimeras no vetor de expressão com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*II. Eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1x. MM – 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen)

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, nós abordamos o tema de estratégias vacinais contra doenças associadas ao papilomavírus bovino por meio da construção dos cassetes de expressão pSP α NEO-L1E5 para futura avaliação da expressão das proteínas obtidas em sistema baseado no protozoário *Leishmania tarentolae* além de, possível viabilização de uma plataforma biotecnológica de produção. Tendo isso em mente, o presente trabalho visou a construção dos cassetes de expressão utilizando genes quiméricos baseados na inserção de epítomos de E5 substituindo a região do loop DE do gene L1. As quimeras L1-E5 foram desenvolvidas no intuito de induzir uma resposta imune tanto humoral (profilática) por parte de L1, quanto celular (para fins terapêuticos) devido a E5. Estratégia semelhante foi empregada por Ashrafi et al. (2008), Mattil-fritz et al. (2008) e Sharma et al. (2012) ao avaliarem uma vacina baseada em VLPs L1-E7 de BPV1. Contudo a resposta terapêutica induzida pela proteína E7 é fraca, como descrito em estudo de Ashrafi et al. (2008), sugerindo que uma resposta mais eficiente poderia ser obtida com a utilização da proteína E5. Dessa forma, a oncoproteína E5 foi escolhida por ser a principal oncoproteína viral do BPV atuando no desenvolvimento dos papilomas. Além disso, o E5 também é responsável pela regulação negativa do MHC de classe I conduzindo à evasão de uma resposta imune terapêutica. Além das quimeras, o gene L1 selvagem também foi produzido para o desenvolvimento de alternativas profiláticas, uma vez que a proteína L1 tem a capacidade de induzir uma alta produção de anticorpos neutralizantes tipo-específicos quando produzida em sistemas recombinantes.

Dentre as vacinas que atualmente vêm sendo desenvolvidas, muitas são produzidas fusionando proteínas as regiões C-terminal e a α -hélice h4 do gene L1, como também pode ser observado em estudos recentes do grupo (MARIZ, 2016). O nosso trabalho optou por utilizar o loop DE para inserção das sequências exógenas de E5 devido, principalmente, à maior exposição das sequências nessa região aumentando a probabilidade de ligação de anticorpos monoclonais aos antígenos de E5. Como visto nos estudos de Sadeyen et al. (2003) a presença de sequências exógenas na região dos loops resultam em uma menor probabilidade de afetar a estrutura tridimensional da proteína quando comparada com mutações nas regiões da α -hélice. Os loops são pequenas regiões que comportam em média poucos nucleotídeos, logo a inserção de sequências muito grandes na região ocasionaria a

perda de sua estrutura. Em vista disso, para evitar alterações na conformação da proteína e, acabar inviabilizando a produção de uma proteína funcional três epítomos diferentes do gene E5 foram selecionados para serem inseridos no loop DE, dado que a inserção do gene inteiro provocaria alterações.

A princípio, as clonagens das quimeras L1-E5 no vetor de passagem pGEM-T Easy não ocorreram como esperado fazendo-se necessário buscar as possíveis causas desse problema e aplicar metodologias que visassem melhorar os resultados. Problemas na reação de adenilação foram observados, uma vez que a ligação dos genes ao vetor não funcionava. Para solucionar esse problema uma nova alíquota de dATP foi preparada, além disso, alguns parâmetros na reação também foram modificados. A concentração da alíquota de dATP preparada aumentou de 2 mM para 5 mM e um volume maior do reagente foi utilizado na adenilação, o mesmo foi feito para as quimeras produzidas, de modo que apenas amostras com concentrações maiores que 30 ng/uL foram utilizados na reação, assim como um volume maior dos insertos.

Para a expressão das proteínas quiméricas de interesse em *L. tarentolae*, foi empregado um sistema *in house* previamente desenvolvido pelo grupo. O vetor não comercial pSP α NEO foi validado e se mostrou eficaz na expressão de proteínas do HPV16 em *Leishmania tarentolae* (MARIZ, 2016). Diferentemente da estratégia utilizada nesse trabalho, estudos recentes comumente vêm empregando vetores comerciais para a produção de proteínas recombinantes do HPV em *L. tarentolae* como indicam Salehi et al. (2012), Bolhassani et al. (2015), Hosseinzadeh et al. (2013) e Shirbaghaee et al. (2015) obtiveram resultados positivos na obtenção das proteínas E7 e L1 do HPV utilizando vetores pLEXSY, embora estudos mais aprofundados sejam necessários para otimizar a eficiência de produção com esse vetor. Ainda que a expressão de proteínas heterólogas seja possível, os vetores comerciais possuem uma grande desvantagem quando comparado aos não comerciais, devido à necessidade de pagamento de *royalties* as empresas detentoras de patentes, uma vez que a vacina venha a ser produzida comercialmente. De modo que a utilização de vetores comerciais gera um impacto no custo da produção da proteína diferente dos vetores não comerciais.

Dificuldades nas subclonagens dos insertos no pSP $\alpha\alpha$ NEO também ocorreram, em decorrência da presença de vetores parcialmente digeridos o que impediu a ligação dos insertos aos sítios de restrição enzimática. Para contornar esse problema, concentrações menores do vetor na reação foram usadas para garantir sua completa digestão. Contudo, após a digestão total foi observado perda do material durante o processo de purificação, de modo que para assegurar uma concentração suficiente do pSP $\alpha\alpha$ NEO para subclonagem foram feitas quatro digestões do vetor que ao final resultaram em uma amostra única a uma concentração de 90 ng/uL.

Até onde se tem conhecimento, não há relato de nenhum estudo utilizando o sistema de *L. tarentolae* para produção de proteínas de BPV, de forma que a construção de cassetes de expressão para produção de antígenos virais nesse protozoário representa uma estratégia inovadora para o controle e combate a doença. Embora o emprego desse protozoário como modelo para estudos bioquímicos e de biologia molecular de Tripanossomatídeos seja bem estabelecido, apenas recentemente vem sendo explorado como um sistema recombinante. Devido principalmente a capacidade de realizar padrões de modificações pós traducionais similar aos encontrados em mamíferos é que esse sistema se mostra atrativo para a produção e estudo de proteínas de mamíferos. A obtenção das quimeras de L1-E5 nesse trabalho possibilita em estudos futuros o desenvolvimento de plataforma biotecnológica para produção de antígenos vacinais contra o BPV1.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a construção dos cassetes de expressão pSP α NEO-L1E5. Os dados apontam para a correta construção das quimeras, que embora tenha sido observada a presença de mutações, as mesmas não seriam capazes de causar alterações significativas nas sequências de proteínas. Estudos mais aprofundados são necessários a fim de determinar a capacidade das quimeras de produzir proteínas funcionais capazes de desencadear estímulos celulares profiláticos e terapêuticos. A utilização das quimeras como antígenos é de grande relevância, uma vez que não existem tratamentos eficientes para o controle da papilomatose bovina. A obtenção de proteínas a partir do sistema heterólogo de *Leishmania tarentolae* apresenta um potencial para produzir proteínas a um baixo custo, comparado às células de mamíferos e de insetos, devido a capacidade de cultivo celular em meios simples e aos altos níveis de expressão relatados. A utilização da *L. tarentolae* como plataforma para o desenvolvimento de estratégias vacinais contra o BPV representa uma abordagem biotecnológica inovadora, sobretudo à luz de uma estratégia pioneira contra a doença. Dessa maneira, a construção dos cassetes possibilita, a partir de análises futuras, o desenvolvimento de uma plataforma para a produção em larga escala de antígenos vacinais contra o BPV.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, R.A.; Scobie, L.; O'Neil, B.W.; Grindlay, G.J.; Campo, M.S. (1997) Viral proteins of bovine papillomavirus type 4 during the development of alimentary canal tumours. **Vet. J.** 154:69–78.
- Ashrafi, G.H.; Piuko, K.; Burden, F.; Yuan, Z.; Gault, E.A.; Müller, M.; Trawford, A.; Reid, S.W.; Nasir, L.; Campo, M.S. (2008) Vaccination of sarcoid-bearing donkeys with chimeric virus-like particles of bovine papillomavirus type 1. **J Gen Virol.** 2008 Jan;89(Pt 1):148-57.
- Basile, G.; Peticca, M. (2009) Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. **Mol Biotechnol** (2009) 43:273–278.
- Bernard H.U. (2005). The clinical importance of the nomenclature, evolution and the taxonomy of human papillomaviruses. **J. Clin. Virol.**, 32: 1-6.
- Bernard, H.U.; Burk, R.D.; Chen, Z. et al. (2010) Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**.,401:70–79.
- Bian T, Wang Y, Lu Z, Ye Z, Zhao L, Ren J, Zhang H, Ruan L e Tian H.(2008) Human papillomavirus type 16 L1E7 chimeric capsomeres have prophylactic and therapeutic efficacy against papillomavirus in mice. **Mol Cancer Ther.** 7: 1329-1335.
- Bishop, B.; Dasgupta, J.; Klein, M.; Garcea, R.L.; Christensen, N.D.; Zhao, R. and Chen, X.S. (2007) Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. **J Biol Chem** 282:31803-31811.
- Bohl, J.; Hull, B.; Vande Pol, S.B. (2001) Cooperative transformation and coexpression of bovine papillomavirus type 1 E5 and E7 proteins, **J. Virol.** 75:513–521.
- Bolhassani, A.; Zahedifard, F. (2012). Therapeutic Live Vaccines as a Potential Anti-Cancer Strategy. **Int J Cancer** 131:1733-43.
- Bolhassani A, Shirbaghaee Z, Agi E, Davoudi N. VLP production in *Leishmania tarentolae*: A novel expression system for purification and assembly of HPV16 L1. **Protein Expr Purif.** (2015) Dec;116:7-11. doi: 10.1016/j.pep.2015.08.024. Epub 2015 Aug 21.
- Borzacchiello, G.; Roperto, F. (2008) Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research, BioMed Central**, 39 (5), pp.1.
- Borzacchiello, G.; Russo, V.; Spoleto, C.; Roperto, S.; Balcos, L.; Rizzo, C.; Venuti, A.; Roperto, F. (2007) Bovine papillomavirus type-2 DNA and expression of E5 and E7 oncoproteins in vascular tumours of the urinary bladder in cattle. **Cancer Letters** 250 82–91

Breton, M.; Tremblay, M.J.; Ouellette, M.; Papadopoulou, B. (2005) Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. **Infect Immun** 73:6372–82.

Breton, M.; Zhao, C.; Ouellette, M. Tremblay, M.J.; Papadopoulou, B. (2007) A recombinant non-pathogenic *Leishmania* vaccine expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection. **J Gen Virol**, v. 88, n. Pt 1, p. 217-25, Jan 2007. ISSN 0022-1317.

Buck, C.B.; Day, P.M.; Trus, B.L. (2013) The papillomavirus major capsid protein L1. **Virology**. 2013 Oct;445(1-2):169-74.

Burnett, S.; Jareborg, N.; and DiMaio, D. (1992) Localization of bovine papillomavirus type 1 E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 89, 5665–5669.

Campo, M.S. (1992) Cell transformation by animal papillomaviruses. **J Gen Virol**. Feb;73 (Pt 2):217-22.

Campo, M.S. (1997). Bovine papillomavirus and cancer. **Vet J**. 1997 Nov;154(3):175-88.

Campo, M.S., (2006). **Bovine papillomavirus: old system, new lessons?**, in: Campo, M.S. (Eds.), *Papillomavirus Biology: from Natural History to Vaccine and Beyond*. Caister Academic Press, Wymondham, England.

Carvalho, C. C. R. ; Batista, M. V. A. ; Silva, M. A. R. ; Balbino, V. Q. ; Freitas, A. C. Detection of Bovine Papillomavirus Types, Co-Infection and a Putative New BPV11 Subtype in Cattle. **Transbound Emerg Dis**, v. 9, p. no-no, 2012.

Chen, X.S., Garcea, R.L., Goldberg, I., Casini, G., Harrison, S.C., (2000). Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. **Mol. Cell** 5, 557–567.

Claus MP, Vivian D, Lunardi M, Alfieri AF, Alfieri AA (2007). Phylogenetic analysis of bovine papillomavirus associated with skin warts in cattle herds from the state of Paraná. **Pesq Vet Bras**, 27: 314-318.

Comenale, G. *Expressão e purificação da proteína recombinante L2 do Papilomavírus bovino tipo-2 em sistema bacteriano*. (2012). São Paulo. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, 2012.

Cordeiro, M. N.; Paolini, F.; Massa, S.; Curzio, G.; Illiano, E.; Duarte Silva, A. J.; Franconi, R.; Bissa, M.; Morghen, C. D. G.; De Freitas, A. C.; Venuti, A. Anti-tumor effects of genetic vaccines against HPV major oncogenes. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 11, n. 1, p. 45–52, jan. 2015.

Corteggio, A.; Altamura, G.; Roperto, F.; Borzacchiello, G. (2013). Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one?. **Infect Agent Cancer**. 2013; 8: 1.

Coutinho, L.C.A.; Jesus, A.L.S.; Fontesa, K.F.L.P ; Coimbra, E.C.; Mariz, F.C.; de Freitas, A.C.; de Cássia Carvalho Maia, R.; de Castro, R.S. (2013) Production of Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) antigen in *Pichia pastoris*. **Journal of Virological Methods** 191 95– 100.

Day, P.M.; Schiller, J.T. (2006) **Early events in the papillomaviral life cycle**, in: Campo M.S. (Ed.), Papillomavirus research from natural history to vaccines and beyond, Caister Academic Press, Norfolk, , pp. 174–192.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C and Crawford L (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. **Nature** 352:824-7.

Doorbar, J.; Quint, W.; Banks, L.; Bravo, I.G.; Stoler, M.; Broker, T.R.; Stanley, M.A. (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**. Nov 20;30 Suppl 5:F55-70.

Freitas, A.C.; Silva, M.A.R.; Jesus, A.L.S.; Mariz, F.C.; Cordeiro, M.N.; Albuquerque, B.M.F. and Batista, M.V.A. (2011) Recent insights into Bovine Papillomavirus. **African Journal of Microbiology Research** Vol. 5(33), pp. 6004-6012.

Garcea, R.L. and Chen, X. (2007) **Papillomavirus structure and assembly**. In: Garcea RL and DiMaio D (eds) The papillomaviruses. Springer, New York.

Gopal GJ, Kumar A (2013) Strategies for the Production of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **Prot J**. 32: 419–425.

Hernandez, B.Y; Ton, T.; Shvetsov, Y.B.; et al. (2012) Human papillomavirus (HPV) L1 and L1-L2 virus-like particle-based multiplex assays for measurement of HPV virion antibodies. **Clin Vaccine Immunol**. Sep;19(9):1348-52.

Horwitz, B.H.; Burkhardt, A.L.; Schlegel, R.; DiMaio, D. (1988) 44-Amino-acid E5 transforming protein of bovine papillomavirus requires a hydrophobic core and specific carboxyl-terminal amino acids. **Mol Cell Biol**, 8(10):4071–4078.

Hosseinzadeh, S.; Bolhassani, A.; Rafati, S.; Taheri, T.; Zahedifard, F.; Daemi, A.; Taslimi, Y.; Hashemi, M.; Memarnejadian, A. (2013) A non-pathogenic live vector as an efficient delivery system in vaccine design for the prevention of HPV16 E7-overexpressing cancers. **Drug Deliv**, v. 20, n. 3-4, p. 190-8, 2013.

Huang C-Jr; Lin H; Yang X (2012) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 39: 383–399.

Jagu, S.; Kwak, K.; Garcea, R.L.; Roden, R.B. (2010) Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or capsomeres to broaden protection against HPV infection. **Vaccine**. 2010 Jun 17;28(28):4478-86.

Jesus, A.L.S. *Desenvolvimento de estratégias vacinais contra doenças associadas ao Papilomavírus bovino*. (2013) Recife. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

Jesus, A.L.; Mariz, F.C.; Souza, H.M.; Cordeiro, M.N.; Coimbra, E.C; Leitão, M.C.; Nascimento, L.M.; Stocco, R.C.; Beçak, W.; Freitas, A.C. Expression of the bovine papillomavirus type 1, 2 and 4 L1 genes in the yeast *Pichia pastoris*. **Genet Mol Res.** (2012) Aug 16;11(3):2598-607. doi: 10.4238/2012.July.19.2.

Johnson, K.M.; Kines, R.C.; Roberts, J.N.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T.; and Day, P.M. (2009) Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. **J Virol** 83, 2067-2074.

Joyce, J.G.; Tung, J.S.; Przysiecki, C.T.; Cook, J.C.; Lehman, E.D.; Sands, J.A.; Jansen, K.U. and Keller, P.M. (1999) The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. **J Biol Chem** 274:5810-5822.

Kirnbauer, R.; Booyt, F.; Chengt, N.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Sciences-New York**, v. 89, n. December, p. 12180–12184, 1992

Kirnbauer, R.; Taub, J.; Greenstone, H.; Roden, R.; Durst, M.; Gismann, L.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T. Efficient Self-Assembly of Human Papillomavirus Type 16 L1 and L1-L2 into Virus-Like Particles. **Journal of Virology**, v. 67, n. 12, p. 6929–6936, 1993

Lima, E.G.; Lira, R.C.; Jesus, A.L.S.; Dhalia, R. and Freitas, A.C. (2014). Development of a DNA-based vaccine strategy against bovine papillomavirus infection, involving the E5 or L2 gene. **Genetics and Molecular Research** 13 (1): 1121-1126 (2014)

Ludmerer, S.W.; McClements, W.L.; Wang, X.M.; Ling, J.C.; Jansen, K.U.; Christensen, N.D. (2000) HPV11 mutant virus-like particles elicit immune responses that neutralize virus and delineate a novel neutralizing domain. **Virology**, v. 266, p. 237-245, 2000.

Maeda, Y.; Shibahara, T.; Wada, Y.; Kadota, K.; Kanno, T.; Uchida, I.; Hatama, S. (2007). An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. **Veterinary Microbiology** 121 (2007) 242–248.

Macauley-Patrick, S.; Fazenda, M.L.; McNeil, B.; Harvey, L.M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p. 249-270, 2005.

Mariz, F.C. *Expressão do gene L1 de HPV-16 em Pichia pastoris empregando promotor induzível pAOX1 e promotor constitutivo pPGK1 visando desenvolvimento de um sistema para produção vacinal.* (2012) Recife. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) – Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

Mariz, F.C. *Desenvolvimento de duas plataformas biotecnológicas baseadas em Pichia pastoris e Leishmania tarentolae para produção de candidatos vacinais contra os Papilomavírus humano (HPV) e bovino (BPV).* (2016) Recife. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

Mattil-Fritz, S.; Scharner, D.; Piuko, K.; Thones, N.; Gissmann, L.; Muller, H.; Muller, M. Immunotherapy of equine sarcoid: dose-escalation trial for the use of chimeric papillomavirus-like particles. **The Journal of General Virology**, v. 89, n. Pt 1, p. 138–47, jan. 2008.

McClements, W.L.; Wang, X.M.; Ling, J.C.; Skulsky, D.M.; Christensen, N.D.; Jansen, K.U.; Ludmerer, S.W. (2001) A novel human papillomavirus type 6 neutralizing domain comprising two discrete regions of the major capsid protein L1. **Virology**, v. 289, p. 262-268, 2001.

Mizbani, A.; Taheri, T.; Zahedifardam, F.; Taslimi, Y.; Azizi, H.; Azadmaneshc, K.; Papadopoulos, B.; Rafati, S. (2010). Recombinant Leishmania tarentolae expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. **Vaccine** 28:53-62.

Modis, Y.; Trus, B.L. and Harrison, S.C. (2002) Atomic model of the papillomavirus capsid. **The EMBO Journal** 21(18):4754-4762.

Módolo, D.G. (2014) **Proteína L1 de Papilomavírus bovino (BPV-1): Produção em bactéria e plantas de tabaco**. Campinas. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas.

Munday, J.S. Bovine and Human Papillomaviruses: A Comparative Review. **Veterinary Pathology** 1-13. 2014

Munger, K. and Howley, P.M. (2002) Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Res** 89:213-228.

Nasir, L.; Campo, M.S. (2008). Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovids and equids. **Vet Dermatol**, 19(5):243–254.

Nicholls, P.K. and Stanley, M.A. (2000) The immunology of animal papillomaviruses. **Vet Immunol Immunopathol** 73:101-127.

Niimi, T. (2012). Recombinant Protein Production in the Eukaryotic Protozoan Parasite Leishmania tarentolae: A Review. **Methods Mol Biol** 824:307-15.

O'brien, P.M.; Campo, M.S. Papillomaviruses: a correlation between immune evasion and oncogenity? **Trends Microbiol**, v.11, n.7, p. 300-5, Jul 2003.

Pacheco B, Crombet L, Loppnau P, Cossar D (2012) A screening strategy for heterologous protein expression in Escherichia coli with the highest return of investment. **Prot Exp Purif**. 81: 33–41.

Plano mais pecuária / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília: MAPA/ACS, 2014. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/Publicacao_v2.pdf> Acesso em agosto de 2016.

Rai GK, Saxena M, Singh V, Somvanshi R, Sharma B (2011). Identification of bovine papilloma virus 10 in teat warts of cattle by DNase-SISPA. **Vet. Microbiol.**, 147: 416-419.

Raymond, F.; Boisvert, S.; Roy, G.; Ritt, J.F.; Légaré, D.; Isnard, A.; Stanke, M.; Olivier, M.; Tremblay, M.J.; Papadopoulou, B.; Ouellette, M.; Corbeil, J. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Research** (2012), Vol. 40, No. 3 1131–1147.

Rector A, Van Ranst M. Animal papillomaviruses. **Virology**. 2013;445:213–223.

Richards, R.M.; Lowy, D.R.; Schiller, J.T.; and Day, P.M. (2006) Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103, 1522-1527.

Sá e Silva M, Weiss M, Brum MCS, dos Anjos BL, Torres FD, Weiblen R, Flores EF (2010). Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 22: 603-606.

Sadeyen, J.R.; Tourne, S.; Shkreli, M.; Sizaret, P.Y.; Coursaget, P. (2003) Insertion of a foreign sequence on capsid surface loops of human papillomavirus type 16 virus-like particles reduces their capacity to induce neutralizing antibodies and delineates a conformational neutralizing epitope. **Virology**. 2003 Apr 25;309(1):32-40.

Salehi, M.; Taheri, T.; Mohit, E.; Zahedifard, F.; Seyed, N.; Taslimi, Y; Sattari, M.; Bolhassani, A.; Rafati, S. (2012) Recombinant *Leishmania tarentolae* encoding the HPV type 16 E7 gene in tumor mice model. **Immunotherapy**. Nov;4(11):1107-20. doi: 10.2217/imt.12.110.

Santos, R.C.S.; Lindsey, C.J.; Ferraz, O.P.; Pinto, J.R.; Mirandola, R.S.; Benesi, F.J.; Birgel, E.H.; Pereira, C.A.B.; Beçak, W. 1998. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: on experimental model. **J. Gen. Virol.**79(9): 2127-2135.

Scala C, Ortiz K, Catinaud J, Lemberger K. Hematuria and urinary bladder lesions compatible with bracken fern (*Pteridium aquilinum*) intoxication in captive fallow deer (*Dama dama*). **J Zoo Wildl Med**. 2014 Jun;45(2):380-5.

Schellenbacher C, Roden R and Kirnbauer R (2009). Chimeric L1-L2 Virus-Like Particles as Potential Broad-Spectrum Human Papillomavirus Vaccines. **J. Virol**. 2009, 83(19):10085.

Schiller, J.; Muller, M. Next generation prophylactic human papillomavirus vaccines. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 5, p. e217–25, maio 2015.

Schiller, J.T.; Lowy, D.R. Papillomavirus-Like Particle Vaccines. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, n. 28, p. 50–54, 2000.

Schmitt M, Fiedler V, Müller M (2010). Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPV genotyping assay. **J. Virol. Methods**, 170: 67-72.

Sharma C, Dey B, Wahiduzzaman M, Singh N (2012). Human papillomavirus 16 L1-E7 chimeric virus like particles show prophylactic and therapeutic efficacy in murine model of cervical cancer. **Vaccine**. 2012 Aug 3;30(36):5417-24.

Shirbaghaee, Z.; Bolhassani, A.; Mirshafiey, A.; Motevalli, F.; Zohrei, N.; A Live Vector Expressing HPV16 L1 Generates an Adjuvant-Induced Antibody Response In-vivo. **Iran J Cancer Prev**. (2015) Dec;8(6):e3991. doi: 10.17795/ijcp-3991. Epub 2015 Dec 23.

Slupetzky, K.; Gambhira, R.; Culp, T.D. et al. (2007) A papillomavirus-like particle (VLP) vaccine displaying HPV16 L2 epitopes induces cross-neutralizing antibodies to HPV11. **Vaccine**. 2007 Mar 1;25(11):2001-10.

Smith B.L., **The toxicity of bracken fern (genus *Pteridium*) to animals and its relevance to man**, in: D'Mello J.P.F. (Ed.), Handbook of plant and fungal toxicants, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 1997, pp. 63–76.

Silva, L.A.F.; Veríssimo, A.C.C.; Filho, P.R.L.V.; Fioravanti, M.C.S.; Eurides, D.; Linhares, G.C.F.; Romani, A.F.; Trindade, B.R. (2004). Eficiência da repetição de diferentes protocolos de tratamentos para papilomatose bovina. **Revista da FZVA**, 11: 153-165.

Silvestre O, Borzacchiello G, Nava D, Iovane G, Russo V, Vecchio D, D'Ausilio F, Gault EA, Campo MS, Paciello O (2009). Bovine papillomavirus type 1 DNA and E5 oncoprotein expression in water buffalo fibropapillomas. **Vet Pathol**, 46(4):636–641.

Stanley, M A. Human papillomavirus vaccines. **Reviews in Medical Virology**. v. 16 (3), p. 139–149, 2006.

Strasser AWM and Gellissen G (1998) Yeast expression systems and their competitive environment. **Pharm Manuf Int** 3:151-152.

Tenzer, S.; Peters, B.; Bulik, S.; Schoor, O.; Lemmel, C.; Schatz, M.M.; Kloetzel, P.M.; Rammensee, H.G.; Schild, H.; Holzthutter, H.G. (2005) Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. **Cell Mol Life Sci** 62:1025-1037.

Tomita Y, Literak I, Ogawa T, Jin Z, Shirasawa H (2007). Complete genomes and phylogenetic positions of bovine papillomavirus type 8 and a variant type from a european bison. **Virus Genes**, 35(2):243–249.

Venuti, A.; Paolini, F.; Nasir, L.; Corteggio, A.; Roperto, S.; Campo, M.S.; Borzacchiello, G. (2011) Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. **Mol Cancer**, 10(1):140

de Villiers E.M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U and zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. **Virology** 324:17-27

de Villiers E.M. (2013) Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**. 2013;445:2–10.

Xu, Y.F.; Zhang, Y.Q.; Xu, X.M.; Song, G.X. (2006) Papillomavirus virus-like particles as vehicles for the delivery of epitopes or genes. **Arch Virol**, v. 151, p. 2133-2148, 2006.

Wakabayashi MT, Da Silva DM, Potkul RK, Kast WM (2002). Comparison of Human Papillomavirus Type 16 L1 Chimeric Virus-Like Particles versus L1/L2 Chimeric Virus-Like Particles in Tumor Prevention. **Intervirology** 2002;45:300–307.

Wolf, M.; Garcea, R.L.; Grigorieff, N. & Harrison, S.C. (2010) Subunit interactions in bovine papillomavirus. **PNAS**, 107, 6298–6303.

Yang L, Li R, Mohr IJ, Clark R and Botchan MR (1991) Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2. **Nature** 353(6345):628-32.

9 ANEXOS

As sequências destacadas GGATCC (vermelho), CCATGG (roxo), GCCATG (verde escuro), GGTACC (azul) e TAA (verde claro) se referem respectivamente aos sítios de *Bam*HI, *Nco*I, sequência Kozak, *Kpn*I e códon de parada. As sequências grifadas em amarelo, rosa e cinza correspondem aos diferentes epítomos de E5.

L1/E5.1

CGGGATCCCATGGGCCATGGCGTTGTGGCAACAAGGCCAGAAGCTGTATCTCCCTCCAACCCC
TGTAAGCAAGGTGCTCTGCAGTGAAACCTATGTGCAAGAAAAACATTTTTATCATGCAGAAAC
GGAGCGCCTGCTAACTATAGGACATCCATATTACCCAGTGTCTATCGGGGACAAAACCTGTTCCCTA
AGGTCTCTGCAAATCAGTATAGGGTATTTAAATACAGCTACCTGATCCCAATCAATTTGCACTAC
CTGACAGGACTGTTCAACCCCAAGTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCAGTCATAGGTGTGCAAGT
GTCCAGAGGGCAGCCTCTTGGAGGTACTGTAAGTGGGCACCCCACTTTTAATGCTTTGCTTGATG
CAGAAAATGTGAATCTATGGTTTCTATTGTTCTTGGGAACAACAGATGACAGGAAACAAACAGGCT
TAGATGCTAAGCAACAACAGATTTTGTGCTAGGCTGTACCCCTGCTGAAGGGGAATATTGGACA
ACAGCCCGTCCATGTGTTACTGATCGTCCAGATAAAGGCGCCTGCCCTCCTCTTGAATTAATAA
CAAGCACATAGAAGATGGGGATATGATGGAAATTGGGTTTGGTGCAGCCAACTTCAAAGAAATTA
ATGCAAGTAAATCAGATCTACCTCTTGACATTCAAATGAGATCTGCTTGTACCCAGACTACCTCA
AAATGGCTGAGGACGCTGCTGGTAATAGCATGTTCTTTTTTGCAAGGAAAGAGCAGGTGTATGTT
AGACACATCTGGACCAGAGGGGGCTCGGAGAAAGAAGCCCCTAGTACAGAATTTTATTTAAAAA
TAATAAAGGGGATGCCAGCCTTAAATACCCAGTGTGCATTTTGGAAAGTCCCAGTGGCTCACTAG
TCTCAACTGATAATCAAATTTTAATCGGCCTTACTGGCTATTCCGTGCCCAGGGCATGTACAATG
GAATTGCATGGAATAATTTATTGTTTTTAACAGTGGGGGACAATACACGTGGTACTAATCTTACCA
TAAGTGTAGCCTCAGATGAGACCCCACTAAAAGAGTATGATAGCACAAAATTCAATGTATACCATA
GACATATGGAAGAATATAAGCTAGCCTTTATATTAGAGCTATGCTCTGTGGAATCACAGCTCAA
CTGTGTCACATCTGCAAGGACTTATGCCCTCTGTGCTTCAAATTTGGGAATAGGTGTGCAGCCT
CCTACNTCATCGATATTAGAGGACACCTATCGGTATATAGAGTNTCCTGCAACTAAATGTGCAAGC
AATGTAATTCCTGCAAAAAGAAGACCCTTATGCAGGGTTTAAATTTTGGAACATAGATCTTAAAGAA
AAGCTTTCTTTGGACTTAGATCAATTTCCCTTGGGAAGAAGATTTTATAGCACAGCAAGGGGCAGG
ATGTTCCACTGTGAGAAAACGAAGAATTAGCCAAAAAACTTCCAGTAAGCCTGCAAAAAAAAAA
AAAAAAGGTACCC

L1/E5.2

CGGGATCCCATGGGCCATGGCGTTGTGGCAACAAGGCCAGAAGCTGTATCTCCCTCCAACCCC
TGTAAGCAAGGTGCTCTGCAGTGAAACCTATGTGCAAGAAAAACATTTTTATCATGCAGAAAC
GGAGCGCCTGCTAACTATAGGACATCCATATTACCCAGTGTCTATCGGGGACAAAACCTGTTCCCTA
AGGTCTCTGCAAATCAGTATAGGGTATTTAAATACAGCTACCTGATCCCAATCAATTTGCACTAC
CTGACAGGACTGTTCAACCCCAAGTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCAGTCATAGGTGTGCAAGT
GTCCAGAGGGCAGCCTCTTGGAGGTACTGTAAGTGGGCACCCCACTTTTAATGCTTTGCTTGATG
CAGAAAATGTGAATTACTGGGATCATTTTGAGTGCTCCACAACAGATGACAGGAAACAAACAGGC
TTAGATGCTAAGCAACAACAGATTTTGTGCTAGGCTGTACCCCTGCTGAAGGGGAATATTGGAC
AACAGCCCGTCCATGTGTTACTGATCGTCCAGATAAAGGCGCCTGCCCTCCTCTTGAATTAATAA
ACAAGCACATAGAAGATGGGGATATGATGGAAATTGGGTTTGGTGCAGCCAACTTCAAAGAAATT
AATGCAAGTAAATCAGATCTACCTCTTGACATTCAAATGAGATCTGCTTGTACCCAGACTACCTC
AAAATGGCTGAGGACGCTGCTGGTAATAGCATGTTCTTTTTTGCAAGGAAAGAGCAGGTGTATGT
TAGACACATCTGGACCAGAGGGGGCTCGGAGAAAGAAGCCCCTAGTACAGAATTTTATTTAAAAA
ATAATAAAGGGGATGCCAGCCTTAAATACCCAGTGTGCATTTTGGAAAGTCCCAGTGGCTCACTA
GTCTCAACTGATAATCAAATTTTAATCGGCCTTACTGGCTATTCCGTGCCCAGGGCATGTACAAT

GGAATTGCATGGAATAATTTATTGTTTTTAACAGTGGGGGACAATACACGTGGTACTAATCTTACC
ATAAGTGTAGCCTCAGATGAGACCCCACTAAAAGAGTATGATAGCACAAAATTCATGTATACCAT
AGACATATGGAAGAATATAAGCTAGCCTTTATATTAGAGCTATGCTCTGTGGAATCACAGCTCAA
ACTGTGTCACATCTGCAAGGACTTATGCCCTCTGTGCTTCAAATTTGGGAAATAGGTGTGCAGCN
TCCTACNTCATCGATATTAGAGGACACCTATCGGTATATAGAGTNTCCTGCAACTAAATGTGCAAG
CAATGTAATTCCTGCAAAAGAAGACCCTTATGCAGGGTTTAAATTTTGGAACATAGATCTTAAAGA
AAAGCTTTCTTTGGACTTAGATCAATTTCCCTTGGGAAGAAGATTTTATGCACAGCAAGGGGCAG
GATGTTCCACTGTGAGAAAACGAAGAATTAGCCAAAAAACTTCCAGTAAGCCTGCAAAAAAAAAA
AAAAA**TAAGGTACCC**

L1/E5.3

CG**GGATCCCCATGGGCCATG**GCGTTGTGGCAACAAGGCCAGAAGCTGTATCTCCCTCCAACCCC
TGTAAGCAAGGTGCTCTGCAGTGAAACCTATGTGCAAAGAAAAAACATTTTTTATCATGCAGAAAC
GGAGCGCCTGCTAACTATAGGACATCCATATTACCCAGTGTCTATCGGGGACAAAACCTGTTCCCTA
AGGTCTCTGCAAATCAGTATAGGGTATTTAAATACAGCTACCTGATCCCAATCAATTTGCACTAC
CTGACAGGACTGTTCAACCCCAAGTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCAGTCATAGGTGTGCAAGT
GTCCAGAGGGCAGCCTCTTGGAGGTACTGTAAGTGGGCACCCCACTTTTAATGCTTTGCTTGATG
CAGAAAATGTGAAT**TTGTTTTTCTTGTATACTGGGAT**ACAACAGATGACAGGAAACAAACAGGCT
TAGATGCTAAGCAACAACAGATTTTGTGCTAGGCTGTACCCCTGCTGAAGGGGAATATTGGACA
ACAGCCCGTCCATGTGTTACTGATCGTCCAGATAAAGGCGCCTGCCCTCCTCTTGAATTAATAA
CAAGCACATAGAAGATGGGGATATGATGGAAATTGGGTTTGGTGCAGCCAACCTCAAAGAAATTA
ATGCAAGTAAATCAGATCTACCTCTTGACATTCAAATGAGATCTGCTTGTACCCAGACTACCTCA
AAATGGCTGAGGACGCTGCTGGTAATAGCATGTTCTTTTTTGAAGGAAAGAGCAG-
TGTATGTTAGACACATCTGGACCAGAGGGGGC
CGGAGAAAGAAGCCCCTAGTACAGAATTTTATTTAAAAAATAATAAAGGGGATGCCAGCCTTAAAA
TACCCAGTGTGCATTTTGAAGTCCCAGTGGCTCACTAGTCTCAACTGATAATCAAATTTTTAATC
GGCCTTACTGGCTATTCCGTGCCAGGGCATGTACAATGGAATTGCATGGAATAATTTATTGTTTT
TAACAGTGGGGGACAATACACGTGGTACTAATCTTACCATAAGTGTAGCCTCAGATGAGACCCCA
CTAAAAGAGTATGATAGCACAAAATTCATGTATACCATAGACATATGGAAGAATATAAGCTAGCC
TTTATATTAGAGCTATGCTCTGTGGAATCACAGCTCAAACCTGTGTACATCTGCAAGGACTTATG
CCCTCTGTGCTTCAAATTTGGGAAATAGGTGTGCAGCCTCCTACCTCATCGATATTAGAGGACAC
CTATCGGTATATAGAGTCTCCTGCAACTAAATGTGCAAGCAATGTAATTCCTGCAAAAGAAGACCC
TTATGCAGGGTTTTAAATTTTGAACATAGATCTTAAAGAAAAGCTTTTCTTTGGACTTAGATCAATTT
CCCTTGGGAAGAAGATTTTTAGCACAGCAAGGGGCAGGATGTTCCACTGTGAGAAAACGAAGAAT
TAGCCAAAAAACTTCCAGTAAGCCTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA**TAAGGTACCC**

L1

ATGGCGTTGTGGCAACAAGGCCAGAAGCTGTATCTCCCTCCAACCCCTGTAAGCAAGGTGCTCT
GCAGTGAAACCTATGTGCAAAGAAAAAACATTTTTTATCATGCAGAAACGGAGCGCCTGCTAACTA
TAGGACATCCATATTACCCAGTGTCTATCGGGGACAAAACCTGTTCCCTAAGGTCTCTGCAAATCAGT
ATAGGGTATTTAAATACAGCTACCTGATCCCAATCAATTTGCACTACCTGACAGGACTGTTTACA
ACCCAAGTAAAGAGCGGCTGGTGTGGGCAGTCATAGGTGTGCAAGTGTCCAGAGGGCAGCCTCT
TGGAGGTACTGTAAGTGGGCACCCCACTTTTAATGCTTTGCTTGATGCAGAAAATGTGAATAGAAA
AGTCACCACCCAAACAACAGATGACAGGAAACAAACAGGCTTAGATGCTAAGCAACAACAGATTT
TGTTGCTAGGCTGTACCCCTGCTGAAGGGGAATATTGGACAACAGCCCGTCCATGTGTTACTGAT
CGTCCAGATAAAGGCGCCTGCCCTCCTCTTGAATTAATAAACAAGCACATAGAAGATGGGGATAT
GATGGAAATTGGGTTTGGTGCAGCCAACCTCAAAGAAATTAATGCAAGTAAATCAGATCTACCTCT
TGACATTCAAATGAGATCTGCTTGTACCCAGACTACCTCAAATGGCTGAGGACGCTGCTGGTA
ATAGCATGTTCTTTTTTGAAGGAAAGAGCAGGTGTATGTTAGACACATCTGGACCAGAGGGGGC
TCGGAGAAAGAAGCCCCTAGTACAGAATTTTATTTAAAAAATAATAAAGGGGATGCCAGCCTTAAA
ATACCCAGTGTGCATTTTGAAGTCCCAGTGGCTCACTAGTCTCAACTGATAATCAAATTTTTAAT
CGGCCTTACTGGCTATTCCGTGCCAGGGCATGTACAATGGAATTGCATGGAATAATTTATTGTTT

TTAACAGTGGGGGACAATACACGTGGTACTAATCTTACCATAAGTG TAGCCTCAGATGAGACCCC
ACTAAAAGAGTATGATAGCACAAAATTCAATGTATACCATAGACATATGGAAGAATATAAGCTAGC
CTTTATNTTAGAGNTATGCTCTGTGGAAATCACAGCTCAAAC TGTGTCACATCTGCAAGGACTTAT
GCCCTCTGTGCTTCAA AATTGGGAAATAGGTGTGCAGCNTCCTACCTCATCGATATTAGAGGACA
CCTATCGGTATATAGAGTCTCCTGCAACTAAATGTGCAAGCAATGTAATTCCTGCAAAAGAAGACC
CTTATGCAGGGTTTAAATTTTGGAACATAGATNTTAAAGAAAAGCTTTCTTTGGANTTAGATCAATT
TCCCTTGGGAAGAAGATTTT TAGCACAGCAAGGGGCAGGATGTTNCACTGTGAGAAAANGAAGAA
TTAGCCAAAAAACTTCCAGTAAGCCTGCAAAAAAAAAAAAAAA TAA